

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291437 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.03.22

(22) Дата подачи заявки
2022.03.16

(51) Int. Cl. C07K 14/56 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) МАСКИРОВАННЫЕ АКТИВИРУЕМЫЕ ЦИТОКИНОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

(31) 63/161,913; 63/164,827; 63/254,748;
63/276,893

(32) 2021.03.16; 2021.03.23; 2021.10.12;
2021.11.08

(33) US

(86) PCT/US2022/020492

(87) WO 2022/197764 2022.09.22

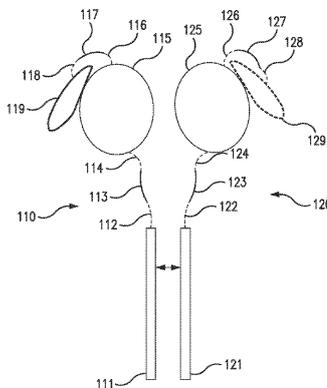
(88) 2022.11.03

(71) Заявитель:
САЙТОМКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Митра Сайанган, Лапуйаде
Николь Г., Асси Хикмат Хайзар,
Паидхунгат Мадан М., Дэниел
Дилан Л., Ле Сколан Эрван,
Богданофф Уолтер А., Цай На, Ван
Синь, Бережной Алексей Евгеньевич
(US)

(74) Представитель:
Тагбергенова А.Т., Тагбергенова М.М.
(KZ)

(57) В данном документе предложены активируемые цитокиновые конструкции, которые включают: (а) первую мономерную конструкцию, содержащую первую пептидную маску (PM1), третий расщепляемый фрагмент (CM3), первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1), при этом CM1 расположен между CP1 и DD1, а CM3 расположен между PM1 и CP1; и (б) вторую мономерную конструкцию, содержащую второй зрелый белок-цитокин (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2), где CM2 расположен между CP2 и DD2, где DD1 и DD2 связывают друг друга; и где АСС характеризуется снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2.



A1

202291437

202291437

A1

МАСКИРОВАННЫЕ АКТИВИРУЕМЫЕ ЦИТОКИНОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и, более конкретно, к активируемым цитокиновым конструкциям.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Цитокины представляют собой семейство встречающихся в природе малых белков и гликопротеинов, продуцируемых и секретируемых большинством ядерных клеток в ответ на вирусную инфекцию и/или другие антигенные стимулы. Интерфероны являются подклассом цитокинов. В настоящее время интерфероны подразделяют на три основных класса: интерфероны I типа, интерфероны II типа и интерфероны III типа. Интерфероны проявляют свою клеточную активность, связываясь со специфическими мембранными рецепторами на клеточной поверхности.

Интерфероновая терапия имеет множество клинических преимуществ. Например, известно, что интерфероны активируют иммунную систему, а также обладают противовирусными и антипролиферативными свойствами. Эти биологические свойства обусловили клиническое применение интерферонов в качестве терапевтических агентов для лечения вирусных инфекций и злокачественных новообразований. Кроме того, интерфероны полезны для вовлечения врожденной иммунной системы пациента в процесс идентификации и атаки на раковые клетки. Соответственно, интерфероновая терапия широко используется при злокачественном новообразовании и противовирусной терапии, в том числе для лечения гепатита, саркомы Капоши, волосатоклеточного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза (СМЛ), фолликулярной лимфомы, почечно-клеточного рака (RCC), меланомы и других патологических состояниях. Однако системное введение интерферонов сопровождается дозозависимой токсичностью, в том числе сильными гриппоподобными симптомами, неврологическими симптомами, гепатотоксичностью, угнетением функции костного мозга и аритмией. В исследовании пациентов с меланомой комбинация пембролизумаба и пэгилированного IFN α привела к частоте объективных ответов («ORR») по оценке исследователя, равной 60,5%. Комбинированное лечение также было связано с 49% нежелательных явлений G3/G4, которые требовали снижения дозы пэгилированного IFN α (Davar et al., J. Clin. Oncol., 2018). Эти нежелательные побочные эффекты ограничивают дозировку терапевтических препаратов на основе интерферона и

иногда приводят к прекращению или отсрочке лечения интерфероном.

Интерлейкины представляют собой еще один подкласс цитокинов. Интерлейкины регулируют рост, дифференцировку и подвижность клеток. Они особенно важны для стимуляции иммунных ответов, таких как воспаление. Интерлейкины использовались для лечения злокачественных новообразований, аутоиммунных заболеваний и других заболеваний. Например, интерлейкин-2 (IL2) предназначен для лечения мелаомы, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), нейробластомы, почечно-клеточного рака (RCC), а также считается полезным при патологических состояниях, включая острый коронарный синдром, острый миелоидный синдром, атопический дерматит, аутоиммунные заболевания печени, базально-клеточную карциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, кандидоз, колоректальный рак, кожную Т-клеточную лимфому, эндометриомы, ВИЧ-инфекцию, ишемическую болезнь сердца, ревматоидный артрит, аденокарциному носоглотки, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак яичников, рак поджелудочной железы, системную красную волчанку, туберкулез и другие заболевания. Другие интерлейкины, такие как IL-6, IL-7, IL-12 и IL-21, среди прочих, являются потенциальными средствами для лечения злокачественных новообразований и других заболеваний. Интерлейкиновая терапия часто сопровождается нежелательными побочными эффектами, в том числе гриппоподобными симптомами, тошнотой, рвотой, диареей, низким кровяным давлением и аритмией.

Таким образом, большой интерес представляет необходимость и стремление к повышению специфичности и селективности цитокиновой терапии по отношению к желаемой мишени. Улучшение нацеливания терапевтических средств на основе цитокинов на очаг заболевания может снизить токсичность, обусловленную системными механизмами, и обеспечить более широкое терапевтическое применение.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении предложены активируемые цитокиновые конструкции (ACC), которые включают: (а) первый мономер, содержащий первую пептидную маску (PM1), первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый и третий расщепляемые фрагменты (CM1 и CM3), и первый домен димеризации (DD1), где CM1 расположен между CP1 и DD1, а CM3 расположен между PM1 и CP1; и (b) второй мономер, содержащий второй зрелый белок-цитокин (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2), где CM2 расположен между CP2 и DD2, где: CM1, CM2 и CM3 функционируют в качестве субстрата для протеазы; DD1 и DD2 связываются друг с другом; и где ACC

характеризуется снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2. Протеазы(-а), расщепляющие CM1, CM2 и CM3, могут иметь повышенную экспрессию в пораженной ткани (например, опухолевой ткани) по сравнению со здоровой тканью. АСС может активироваться при расщеплении CM1, CM2 и/или CM3 таким образом, что цитокин может проявлять свою активность в пораженной ткани (например, в опухолевом микроокружении), в то время как активность цитокина ослаблена в пределах здоровой ткани. Таким образом, АСС, представленные в данном документе, могут обеспечивать сниженную токсичность по сравнению с традиционными терапевтическими средствами на основе цитокинов, обеспечивать более высокие эффективные дозы цитокина и/или увеличивать терапевтическое окно для цитокина.

В данном документе предусмотрены активируемые цитокиновые конструкции (АСС), которые включают первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, где: (а) первая мономерная конструкция содержит первую пептидную маску (PM1), первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый и третий расщепляемый фрагмент (CM1 и CM3) и первый домен димеризации (DD1), где CM1 расположен между CP1 и DD1, а CM3 расположен между PM1 и CP1; и (б) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый белок-цитокин (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2), где CM2 расположен между CP2 и DD2; где DD1 и DD2 связываются друг с другом, образуя таким образом димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и при этом АСС характеризуется сниженным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2.

В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция дополнительно содержит вторую пептидную маску (PM2) и четвертый расщепляемый фрагмент (CM4), где CM4 расположен между PM2 и CP2. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит первый полипептид, который содержит PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, который содержит CP2, CM2 и DD2. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, содержащий PM2, CM4, CP2, CM2 и DD2.

В некоторых вариантах осуществления PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323 и 331–369, и CP1 представляет собой интерферон; PM1 содержит последовательность, выбранную из

группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323 и 331–364, а CP1 представляет собой интерферон α ; PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 362–364, и CP1 представляет собой интерферон β ; PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 366–369, и CP1 представляет собой интерферон γ ; PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370–374, и CP1 представляет собой IL-12; PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 375–382, 469–477, 478, и CP1 представляет собой IL-15; PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 383–468, 469–478, и CP1 представляет собой IL-2; или PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 478 и 479, и CP1 представляет собой IL-21. В некоторых вариантах осуществления PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323 и 331–369, и CP2 представляет собой интерферон; PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323 и 331–364, а CP2 представляет собой интерферон α ; PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 362–364, и CP2 представляет собой интерферон β ; PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 366–369, и CP2 представляет собой интерферон γ ; PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370–374, и CP2 представляет собой IL-12; PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 375–382, 469–477, 478, и CP2 представляет собой IL-15; PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из группы, состоящей из SEQ ID NO: 383–468, 469–478, а CP2 представляет собой IL-2; или PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 478 и 479, а CP2 представляет собой IL-21. В некоторых вариантах осуществления PM1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328–329, 323 и 331–479. В некоторых вариантах осуществления PM2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328–329, 323 и 331–479.

В некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 представляют собой пару, выбранную из группы, состоящей из: пары доменов Fc, домена sushi из альфа-цепи рецептора IL-15 человека (IL15R α) и растворимого IL-15; барназы и барнстара; протеинкиназы A (PKA) и якорного белка A-киназы (AKAP); модулей адаптера / стыковочной метки на основе мутированных фрагментов РНКазы I; эпитопа и однодоменного антитела (sdAb); эпитопа и одноцепочечного вариабельного фрагмента

(scFv); и модулей растворимых, чувствительных к N-этилмалеимиду рецепторов стыковочных белков (SNARE), основанных на взаимодействии белков синтаксина, синаптоагмина, синаптобревина и SNAP25, антигенсвязывающего домена и эпитопа.

В некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc. В некоторых вариантах осуществления пара доменов Fc представляет собой пару доменов Fc человека. В некоторых вариантах осуществления домены Fc человека представляют собой домены Fc IgG1 человека, домены Fc IgG2 человека, домены Fc IgG3 человека или домены Fc IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления домены Fc человека представляют собой домены Fc IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления каждый из доменов Fc человека содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления каждый из доменов Fc человека содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления домены Fc человека содержат SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 содержат SEQ ID NO: 318 и 319, соответственно. В некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 являются одними и теми же. В некоторых вариантах осуществления домены Fc человека включают мутации, устраняющие гликозилирование и/или уменьшающие связывание с Fc-гамма-рецептором. В некоторых вариантах осуществления домены Fc человека содержат мутацию N297Q, N297A или N297G; в некоторых вариантах осуществления домены Fc человека содержат мутацию в положении 234 и/или 235, например, L235E, или L234A и L235A (в IgG1), или F234A и L235A (в IgG4); в некоторых вариантах осуществления домены Fc человека представляют собой домены Fc IgG2, которые содержат мутации V234A, G237A, P238S, H268Q/A, V309L, A330S или P331S или их комбинацию (все в соответствии с нумерацией EU).

Дополнительные примеры сконструированных доменов Fc человека известны специалистам в данной области техники. Примеры аминокислот константной области тяжелой цепи Ig, в которых мутации по меньшей мере в одной аминокислоте приводят к снижению функции Fc, включают, но не ограничиваются ими, мутации в аминокислотах 228, 233, 234, 235, 236, 237, 239, 252, 254, 256, 265, 270, 297, 318, 320, 322, 327, 329, 330 и 331 константной области тяжелой цепи (согласно нумерации EU). Примеры комбинаций мутантных аминокислот также известны в данной области техники, такие как, помимо прочего, комбинация мутаций в аминокислотах 234, 235 и 331, такая как L234F, L235E и P331S, или комбинация аминокислот 318, 320 и 322, например E318A, K320A и K322A.

Дополнительные примеры сконструированных доменов Fc включают F243L/R292P/Y300L/V305I/P396 IgG1; S239D/I332E IgG1; S239D/I332E/A330L IgG1; S298A/E333A/K334A; в одной тяжелой цепи, L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A IgG1, и в противоположной тяжелой цепи, D270E/K326D, A330M/K334E IgG; G236A/S239D/I332E IgG1; K326W/E333S IgG1; S267E/H268F/S324T IgG1; E345R/E430G/S440Y IgG1; N297A или N297Q или N297G IgG1; L235E IgG1; L234A/L235A IgG1; F234A/L235A IgG4; H268Q/V309L/A330S/P331S IgG2; V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S IgG2; M252Y/S254T/T256E IgG1; M428L/N434S IgG1; S267E/L328F IgG1; N325S/L328F IgG1, и т. п. В некоторых вариантах осуществления сконструированный домен Fc содержит одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из N297A IgG1, N297Q IgG1 и S228P IgG4.

В некоторых вариантах осуществления DD1 содержит антигенсвязывающий домен, а DD2 содержит соответствующий эпитоп. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен к His-метке, и где DD2 содержит His-метку. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из DD1 и DD2 содержит заместитель домена димеризации, выбранный из группы, состоящей из неполипептидного полимера и малой молекулы. В некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 содержат неполипептидные полимеры, ковалентно связанные друг с другом. В некоторых вариантах осуществления неполипептидный полимер представляет собой серосодержащий полиэтиленгликоль, в котором DD1 и DD2 ковалентно связаны друг с другом посредством одной или более дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из DD1 и DD2 содержит малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления малая молекула представляет собой биотин. В некоторых вариантах осуществления DD1 содержит биотин, а DD2 содержит авидин.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 представляют собой зрелые цитокины. В некоторых вариантах осуществления каждый из CP1 и CP2 содержит последовательность зрелого цитокина и дополнительно содержит сигнальный пептид. Сигнальный пептид также упоминается в данном документе как «сигнальная последовательность». В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 по отдельности выбран(-ы) из группы, состоящей из: интерферона, интерлейкина, GM-CSF,

G-CSF, LIF, OSM, CD154, LT- β , TNF- α , TNF- β , 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE, TGF- β 1, TGF- β 1, TGF- β 3, Epo, Tpo, Flt-3L, SCF, M-CSF, и MSP, необязательно, где CP1 и/или CP2 независимо выбраны из IL-2, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, GM-CSF, TGF-бета, LIGHT, GTR-L, CD40L, CD27L, 4-1BB-L, OX40 и OX40L. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 являются одними и теми же. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 различаются. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 представляет собой интерферон. В некоторых вариантах осуществления как CP1, так и CP2 представляют собой интерферон. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 представляют собой разные интерфероны. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 представляют собой один и тот же интерферон. В некоторых вариантах осуществления один из CP1 или CP2 представляет собой интерферон, а другой из CP1 или CP2 представляет собой цитокин, отличный от интерферона. В некоторых аспектах один или оба цитокина представляют собой мономерные цитокины. В некоторых аспектах один или оба интерферона представляют собой мономерные интерфероны. В некоторых аспектах CP1 или CP2 представляет собой мономерный интерферон, а другой CP1 или CP2 представляет собой другой цитокин. В некоторых аспектах CP1 и/или CP2 включают последовательность мутантного цитокина. В некоторых аспектах CP1 и/или CP2 включают последовательность универсального цитокина. В некоторых аспектах CP1 и/или CP2 включают укороченную последовательность, которая сохраняет цитокиновую активность.

В некоторых вариантах осуществления интерферон(-ы) представляет собой человеческий зрелый интерферон дикого типа. В некоторых вариантах осуществления интерферон(-ы) могут представлять собой интерфероны типа I и типа II, например, включая, но не ограничиваясь ими, интерферон альфа, интерферон бета, интерферон гамма, интерферон омега и интерферон тау. В некоторых вариантах осуществления интерфероны представляют собой интерферон альфа. В некоторых вариантах осуществления интерферон(-ы) выбран из группы, состоящей из интерферона альфа-2a, интерферона альфа-2b и интерферона альфа-n3. В некоторых вариантах осуществления интерферон(-ы) представляет собой интерферон альфа-2b. В некоторых вариантах осуществления интерферон(-ы) представляет собой мутантный интерферон. В некоторых вариантах осуществления интерферон(-ы) представляет собой мутантный интерферон, в котором сайт расщепления эндогенной протеазой стал нефункциональным в результате замены, делеции или вставки одной или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления интерферон(-ы) представляет собой молекулу универсального цитокина, например,

имеющую гибридную последовательность различных подтипов цитокина, или химерную последовательность цитокина, или гуманизированную последовательность цитокина. В некоторых вариантах осуществления интерферон(-ы) представляет собой молекулу универсального интерферона. В некоторых вариантах осуществления интерферон(-ы) представляет собой универсальный интерферон альфа, например, гибрид интерферона альфа 1 и интерферона альфа 2а. В некоторых вариантах осуществления СР1 и/или СР2 содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления СР1 и/или СР2 содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления СР1 и/или СР2 содержат последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления интерферон представляет собой интерферон бета. В некоторых вариантах осуществления интерферон бета выбран из группы, состоящей из интерферона бета-1а и интерферона бета-1б. В некоторых вариантах осуществления СР1 и/или СР2 содержит домен IFab. В некоторых вариантах осуществления СР1 и/или СР2 содержит интерлейкин. В некоторых вариантах осуществления интерлейкин выбран из группы, состоящей из IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-18, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-10, IL-20, IL-14, IL-16, и IL-17.

В некоторых вариантах осуществления СМ1 и/или СМ2 содержат в общей сложности от около 3 аминокислот до около 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления СМ1 и СМ2 содержат субстраты для разных протеаз. В некоторых вариантах осуществления СМ1 и СМ2 содержат субстраты для одной и той же протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза(-ы) выбрана(-ы) из группы, состоящей из: ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, BACE, ренина, катепсина D, катепсина E, каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 14, катепсина B, катепсина C, катепсина K, катепсина L, катепсина S, катепсина V/L2, катепсина X/Z/P, крузипаина, легумаина, отубаина-2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, KLK14, меприна, неприлизина, PSMA, BMP-1, матриксных металлопротеиназ (например, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-24, MMP-26, MMP-27), активированного белка C, катепсина A, катепсина G, химазы, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, эластазы, гранзима B, гуанидинобензоатазы, HtrA1, нейтрофильной лиаза человека, лактоферрина, марапсина, NS3/4A, PACE4, плазмина, PSA, tPA, тромбина, триптазы, uPA, DESC1, DPP-4, FAP, гепсина, матриптазы-

2, MT-SP1/матриптазы, TMPRSS2, TMPRSS3, и TMPRSS4. В некоторых вариантах осуществления протеаза(-ы) выбрана(-ы) из группы, состоящей из: uPA, лемуина, MT-SP1, ADAM17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, и MMP-14.

Подходящие расщепляемые фрагменты описаны в WO 2010/081173, WO 2015/048329, WO 2015/116933, WO 2016/118629 и WO 2020/118109, описание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления CM1 и/или CM2 содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из: LSGRSDNH (SEQ ID NO: 5), TGRGPSWV (SEQ ID NO: 6), PLTGRSGG (SEQ ID NO: 7), TARGPSFK (SEQ ID NO: 8), NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 9), NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 10), TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 11), TSGRSANP (SEQ ID NO: 12), VHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 13), AVGLLAPP (SEQ ID NO: 14), AQNLLGMV (SEQ ID NO: 15), QNQALRMA (SEQ ID NO: 16), LAAPLGLL (SEQ ID NO: 17), STFPFGMF (SEQ ID NO: 18), ISSGLLSS (SEQ ID NO: 19), PAGLWLDP (SEQ ID NO: 20), VAGRSMRP (SEQ ID NO: 21), VVPEGRRS (SEQ ID NO: 22), ILPRSPAF (SEQ ID NO: 23), MVLGRSLL (SEQ ID NO: 24), QGRAITFI (SEQ ID NO: 25), SPRSIMLA (SEQ ID NO: 26), SMLRSMPL (SEQ ID NO: 27), ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 29), ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 30), LSGRSGNH (SEQ ID NO: 31), SGRSANPRG (SEQ ID NO: 32), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), LSGRSDIH (SEQ ID NO: 34), LSGRSDQH (SEQ ID NO: 35), LSGRSDTH (SEQ ID NO: 36), LSGRSDYH (SEQ ID NO: 37), LSGRSDNP (SEQ ID NO: 38), LSGRSANP (SEQ ID NO: 39), LSGRSANI (SEQ ID NO: 40), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 41), MIAPVAYR (SEQ ID NO: 42), RPSPMWAY (SEQ ID NO: 43), WATPRPMR (SEQ ID NO: 44), FRLLDWQW (SEQ ID NO: 45), ISSGL (SEQ ID NO: 46), ISSGLLS (SEQ ID NO: 47), ISSGLL (SEQ ID NO: 48), ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 49), AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 50), AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 51), ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 52), ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 53), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 55), ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 56), ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 57), ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 58), ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 59), AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 60), AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 61), AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 62), AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 63), AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 64), AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 65), AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 66), AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 67), ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68), AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 69),

GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 70), GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 71), LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 72), ISSGLSS (SEQ ID NO: 73), PVGYTSSL (SEQ ID NO: 74), DWLYWPGI (SEQ ID NO: 75), LKAAPRWA (SEQ ID NO: 76), GPSHLVLT (SEQ ID NO: 77), LPGGLSPW (SEQ ID NO: 78), MGLFSEAG (SEQ ID NO: 79), SPLPLRVP (SEQ ID NO: 80), RMHLRSLG (SEQ ID NO: 81), LLAPSHRA (SEQ ID NO: 82), GPRSFGL (SEQ ID NO: 83), GPRSFG (SEQ ID NO: 84), SARGPSRW (SEQ ID NO: 85), GGWHTGRN (SEQ ID NO: 86), HTGRSGAL (SEQ ID NO: 87), AARGPAIH (SEQ ID NO: 88), RGPAPNPM (SEQ ID NO: 89), SSRGPAYL (SEQ ID NO: 90), RGPATPIM (SEQ ID NO: 91), RGPA (SEQ ID NO: 92), GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 93), FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 94), SPLTGRSG (SEQ ID NO: 95), SAGFSLPA (SEQ ID NO: 96), LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 97), SGGPLGVR (SEQ ID NO: 98), PLGL (SEQ ID NO: 99), и SGRSDNI (SEQ ID NO: 100). В некоторых вариантах осуществления CM содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), SGRSDNI (SEQ ID NO: 100), и ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68). В некоторых вариантах осуществления протеаза(-ы) продуцируется опухолью субъекта, например, протеаза(-ы) продуцируется в опухоли в больших количествах, чем в здоровых тканях субъекта. В некоторых вариантах осуществления у субъекта было диагностировано или идентифицировано злокачественное новообразование.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и CM1 непосредственно примыкают друг к другу в первой мономерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу в первой мономерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления CP2 и CM2 непосредственно примыкают друг к другу во второй мономерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления CM2 и DD2 непосредственно примыкают друг к другу во второй мономерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит CP1, непосредственно примыкающий к CM1, и CM1, непосредственно примыкающий к DD1, где CM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5–100. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит CP2, непосредственно примыкающий к CM2, и CM2, непосредственно примыкающий к DD2, где CM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5–100. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит CP1, непосредственно примыкающий к CM1, и CM1, непосредственно примыкающий к DD1, где CM1 содержит последовательность не более 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления вторая

мономерная конструкция содержит CP2, непосредственно примыкающий к CM2, и CM2, непосредственно примыкающий к DD2, где CM2 содержит последовательность не более 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая мономерные конструкции имеют такую конфигурацию, что цитокин (CM1 и CM2, соответственно) непосредственно примыкает к расщепляемому фрагменту (CM1 и CM2, соответственно), который имеет длину не более 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислоты, и расщепляемый фрагмент непосредственно примыкает к домену димеризации (DD1 и DD2, соответственно), который представляет собой область Fc IgG человека, где N-конец области Fc представляет собой первый остаток цистеина (чтение в направлении от N к C) в шарнирной области, который задействован в дисульфидной связи со вторым доменом Fc (например, цистеин 226 IgG1 человека, с использованием нумерации EU). В некоторых аспектах домен димеризации представляет собой область Fc IgG, в которой удалены верхние шарнирные остатки. Например, Fc представляет собой вариант, в котором удалены N-концевые последовательности EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 330), ERK, ELKTP LGDTTHT (SEQ ID NO: 365) или ESKYGPP (SEQ ID NO: 317).

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один линкер представляет собой линкер L1, расположенный между PM1 и CM3, и/или линкер L2, расположенный между CM3 и CP1. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один линкер представляет собой линкер L3, расположенный между PM2 и CM4, и/или линкер L4, расположенный между CM4 и CP2. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит линкер L1, а вторая мономерная конструкция содержит линкер L3. В некоторых вариантах осуществления L1 и L3 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит линкер L2, а вторая мономерная конструкция содержит линкер L4. В некоторых вариантах осуществления L2 и L4 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит линкер между CP1 и CM1 и/или линкер между CM1 и DD1. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит линкер между CP2 и CM2 и/или линкер между CM2 и DD2. В некоторых вариантах осуществления каждый линкер имеет общую длину от 1 аминокислоты до около 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления каждый линкер имеет общую длину по меньшей мере 5 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер, где каждый линкер независимо выбран из группы, состоящей из GSSGSGGSGG (SEQ ID NO: 210); GGGS (SEQ ID NO: 2); GGGSGGGS (SEQ ID NO: 211); GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 212); GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213); GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214); GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 215); GGGGS (SEQ ID NO: 216); GS; GGGSGS (SEQ ID NO: 217); GGGSGGGGSGGGSGS (SEQ ID NO: 218); GGS LDPKGGGS (SEQ ID NO: 219); PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 220); SKYGPCCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 221); GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 222); GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 223); GSTSGSGKSSEGSSTKG (SEQ ID NO: 224); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 225); GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226); (GS)_n, (GG)_n, (GSGG)_n (SEQ ID NO: 227), (GGG)_n (SEQ ID NO: 228), (GGGG)_n (SEQ ID NO: 216), где каждый n представляет собой целое число по меньшей мере из одного; GGS (SEQ ID NO: 229); GGS (SEQ ID NO: 230); GSG (SEQ ID NO: 231); GSGG (SEQ ID NO: 232); GGG (SEQ ID NO: 233); GSSG (SEQ ID NO: 234); GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213); GGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214); и GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит последовательность GGGS (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит в направлении от N-конца к C-концу PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1, прямо или опосредованно связанный с C-концом CM1. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит в направлении от C-конца к N-концу PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1, прямо или опосредованно связанный с N-концом CM1. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит в направлении от N-конца к C-концу PM2, CM4, CP2, CM2 и DD2, прямо или опосредованно связанный с C-концом CM2. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит в направлении от C- к N-концу PM2, CM4, CP2, CM2 и DD2, прямо или опосредованно связанный с CM2.

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит в направлении от N-конца к C-концу CP1, необязательный линкер, CM1, необязательный линкер и DD1, где DD1 представляет собой область Fc IgG, где N-конец области Fc представляет собой первый остаток цистеина (читается в направлении от N к C) в шарнирной области, который задействован в дисульфидной связи со вторым доменом Fc (например, цистеин 226 человеческого IgG1 или IgG4, используя нумерацию EU), и где CM1 и любой линкер(-ы), расположенный между CP1 и N-концевым цистеином DD1

(«связывающая область»), имеют общую длину не более 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислот, предпочтительно не более 10 аминокислот, особенно предпочтительно не более 7 аминокислот. В некоторых таких вариантах осуществления первая мономерная конструкция дополнительно содержит в направлении от N-конца к C-концу PM1, необязательный линкер, CM3 и необязательный линкер, присоединенный к N-концу CP1. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит в направлении от N-конца к C-концу CP2, необязательный линкер, CM2, необязательный линкер и DD2, где DD2 представляет собой область Fc IgG, где N-конец области Fc представляет собой первый остаток цистеина (читается в направлении от N к C) в шарнирной области, который задействован в дисульфидной связи со вторым доменом Fc (например, цистеин 226 человеческого IgG1 или IgG4, используя нумерацию EU), и где CM2 и любой линкер(-ы), расположенный между CP2 и N-концевым цистеином В DD2 («связывающая область»), имеют общую длину не более 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислот, предпочтительно не более 10 аминокислот, особенно предпочтительно не более 7 аминокислот. В некоторых таких вариантах осуществления вторая мономерная конструкция дополнительно содержит в направлении от N-конца к C-концу PM2, необязательный линкер, CM4 и необязательный линкер, присоединенный к N-концу CP2. В некоторых аспектах между пептидной маской и расщепляемым фрагментом нет линкера или спейсера. В некоторых аспектах между цитокиновым белком и расщепляемым фрагментом нет линкера или спейсера. В некоторых аспектах между расщепляемым фрагментом и доменом димеризации нет линкера или спейсера.

В некоторых вариантах осуществления АСС представляет собой гомодимер, в котором первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция идентичны и содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 321. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция содержат аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 321. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция содержат в направлении от N-конца к C-концу SEQ ID NO: 323; необязательный гибкий линкер из 0–10 аминокислот; CM, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 100; необязательный гибкий линкер из 0–10 аминокислот; SEQ ID NO:1; второй CM, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 100; и домен димеризации.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность CP1 и/или CP2 представляет собой аффинность связывания CP1 и/или CP2 с его когнатным рецептором, определяемую с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Например, когда CP1 или CP2 представляет собой интерферон, когнатный рецептор может представлять собой рецептор интерферона-альфа/бета (IFNAR). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность CP1 и/или CP2 представляет собой уровень пролиферации клеток лимфомы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность CP1 и/или CP2 представляет собой уровень активации пути JAK/STAT/ISGF3 в клетке лимфомы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность представляет собой уровень продукции секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP) в клетке лимфомы. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 2-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и CP2 по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 5-кратным, 10-кратным, 20-кратным, 50-кратным, 100-кратным, 200-кратным, 300-кратным, 400-кратным, 500-кратным, 600-кратным, 700-кратным, 800-кратным, 900-кратным, 1000-кратным, 1100-кратным, 1200-кратным, 1300-кратным, 1400-кратным, 1500-кратным, 1600-кратным, 1700-кратным, 1800-кратным, 1900-кратным, 2000-кратным, 3000-кратным или 4000-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и CP2 по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 5000-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и CP2 по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 является активность CP1 и/или CP2 в АСС после воздействия на АСС протеазы (протеаз). В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень по меньшей мере одного CP1 и/или CP2 соответствует активности CP1 и/или CP2 соответствующего зрелого цитокина дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия протеазы (протеаз), где продукт расщепления включает по меньшей мере одну активность CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность CP1 и/или CP2 представляет собой антипролиферативную активность. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень представляет собой значение EC50 зрелого цитокина дикого типа, при этом отношение EC50 (продукт расщепления) к EC50 (контрольный уровень дикого типа) составляет менее около 10, или менее около 9, или менее около 8, или менее около 7, или

менее около 6, или менее около 5, или менее около 4, или менее примерно 3, или менее около 2, или менее около 1,5, или равный около 1. В некоторых вариантах осуществления ЕС50 продукта расщепления примерно такая же, как ЕС50 зрелого цитокина дикого типа, демонстрируя, что после расщепления активность CP1 и/или CP2 полностью или почти полностью восстанавливается.

В данном документе представлены композиции, содержащие любую из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию. Также в данном документе представлены наборы, содержащие по меньшей мере одну дозу любой из описанных в данном документе композиций.

В данном документе предложены способы лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из АСС, описанных в данном документе, или любой из композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления у субъекта идентифицировано или диагностировано злокачественное новообразование. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой саркому Капоши, волосатоклеточный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз (СМЛ), фолликулярную лимфому, почечно-клеточный рак (RCC), меланому, нейробластому, базально-клеточную карциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, колоректальный рак, кожную Т-клеточную лимфому, аденокарциному носоглотки, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак яичников, рак поджелудочной железы. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой лимфому. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления лимфома представляет собой лимфому Беркитта.

В данном документе представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, который содержит CP1 и CM1 любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит любой из DD1, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит любой из PM1 и CM3, описанных в данном документе. В данном документе также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, который содержит CP2 и CM2 любой из АСС, описанных в данном документе. Когда мономеры идентичны, в настоящем изобретении предложена одна нуклеиновая кислота, кодирующая мономер, который димеризуется с образованием АСС. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит любой из DD2, описанных в данном документе. В

некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит любой из РМ2 и СМ4, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция содержат идентичные компоненты СР, СМ и DD. В некоторых из этих вариантов осуществления первая и вторая мономерные конструкции кодируются одним и тем же полипептидом (т. е. одной и той же аминокислотной последовательностью). Часто, когда первая и вторая мономерные конструкции содержат одну и ту же аминокислотную последовательность, они кодируются одной и той же нуклеиновой кислотой (т. е. одной и той же последовательностью нуклеиновой кислоты). В некоторых из этих вариантов осуществления первая и вторая мономерные конструкции кодируются одной и той же нуклеиновой кислотой. Также в данном документе представлены векторы, содержащие любую из описанных в данном документе нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии. Также в данном документе представлены клетки, содержащие любую из описанных в данном документе нуклеиновых кислот или любой из описанных в данном документе векторов.

В данном документе представлены пары нуклеиновых кислот, которые вместе кодируют полипептид, содержащий СР1 и СМ1 первой мономерной конструкции, и полипептид, содержащий СР2 и СМ2 второй мономерной конструкции любой из АСС, описанных в данном документе. В данном документе также представлены пары нуклеиновых кислот, которые вместе кодируют полипептид, содержащий РМ1, СМ3, СР1 и СМ1 конструкции первого мономера, и полипептид, содержащий РМ2, СМ4, СР2 и СМ2 второго мономерной конструкции любой из АСС, описанных в данном документе. Также в данном документе представлены пары векторов, которые вместе содержат любую из пары нуклеиновых кислот, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления пара векторов представляет собой пару векторов экспрессии. Также в данном документе представлены клетки, содержащие любую из пар нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, или любую из пар векторов, описанных в данном документе. В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий пару векторов.

В данном документе предложены способы получения АСС, включающие: культивирование любой из описанных в данном документе клеток в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для получения АСС; и выделение АСС из клетки или жидкой культуральной среды. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает: выделение АСС, выделенной из клетки или жидкой культуральной среды. В

некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает: введение выделенного АСС в фармацевтическую композицию.

В данном документе представлены АСС, полученные любым из описанных в данном документе способов. Также в данном документе представлены композиции, содержащие любую из АСС, описанных в данном документе. Также в данном документе представлены композиции любой из описанных в данном документе композиций, где композиция представляет собой фармацевтическую композицию. Также в данном документе представлены наборы, содержащие по меньшей мере одну дозу любой из описанных в данном документе композиций.

Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно подразумевается рядовым специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. В данном документе описаны способы и материалы для применения в данном изобретении; также могут быть использованы другие подходящие способы и материалы, известные в данной области техники. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не имеют ограничительного характера. Все публикации, заявки на патенты, патенты, последовательности, записи в базе данных и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены посредством ссылки. В случае конфликта, данное описание, включая определения, является превалирующим.

Другие признаки и преимущества данного изобретения станут очевидными из следующего подробного описания и фигур, а также из формулы изобретения.

Форма единственного числа используется для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. Например, «клетка» включает одну или более клеток.

В контексте данного документа термины «около» и «приблизительно», когда они используются для изменения количества, указанного в числовом значении или диапазоне, указывают, что числовое значение, а также разумные отклонения от значения, известные специалисту в данной области техники. Например, $\pm 20\%$, $\pm 10\%$ или $\pm 5\%$, находятся в пределах предполагаемого значения указанного значения, где это уместно.

Концентрации, количества и другие числовые данные могут быть выражены или представлены в данном документе в формате диапазона. Следует понимать, что такой формат а диапазона используется просто для удобства и краткости и, таким образом, должен быть гибко интерпретирован для включения не только числовых значений, явно упоминаемых как пределы данного диапазона, но и включения всех отдельных числовых

значений или поддиапазонов в пределах данного диапазона, как если бы каждое числовое значение и поддиапазон явно упоминались. В качестве иллюстрации числовой диапазон «от около 0,01 до 2,0» следует интерпретировать как включающий не только явно указанные значения от около 0,01 до около 2,0, но также включающие отдельные значения и поддиапазоны в пределах указанного диапазона. Таким образом, в этот числовой диапазон включены отдельные значения, такие как 0,5, 0,7 и 1,5, и поддиапазоны, такие как от 0,5 до 1,7, от 0,7 до 1,5 и от 1,0 до 1,5 и т. д. Кроме того, такая интерпретация должна применяться независимо от широты диапазона или описываемых характеристик. Кроме того, следует отметить, что все проценты указаны по массе, если не указано иное.

При понимании объема настоящего изобретения термины «включающий» или «содержащий» и их производные, как они используются в данном документе, предназначены для открытых терминов, которые определяют наличие заявленных признаков, элементов, компонентов, групп, целых чисел, и/или стадий, но не исключают наличия других неустановленных функций, элементов, компонентов, групп, целых чисел и/или стадий. Вышеизложенное также относится к словам, имеющим аналогичные значения, таким как термины «включая», «имеющий» и их производные. В контексте данного документа термин «состоящий» и его производные предназначены для применения в качестве закрытых терминов, которые определяют наличие заявленных признаков, элементов, компонентов, групп, целых чисел и/или стадий, но исключают наличие других неуказанных признаков, элементы, компоненты, группы, целые числа и/или стадий. В контексте данного документа термин «состоящий в основном из» предназначен для указания наличия заявленных признаков, элементов, компонентов, групп, целых чисел и/или стадий, а также тех, которые существенно не влияют на основную и новую характеристику (характеристики) функций, элементов, компонентов, групп, целых чисел и/или стадий. Понятно, что ссылка на любой из этих переходных терминов (т. е. «содержащий», «состоящий» или «состоящий по существу») обеспечивает прямую поддержку замены любым другим переходным термином, который конкретно не используется. Например, изменение термина «состоящий» на «состоящий в основном из» или «состоящий из» нашло бы прямую поддержку благодаря этому определению для любых элементов, раскрытых в этом описании. На основании этого определения любой элемент, описанный в данном документе или включенный посредством ссылки, может быть включен или исключен из заявленного изобретения.

Как используется в данном документе, множество соединений, элементов или стадий могут быть представлены в общем списке для удобства. Однако эти списки следует

толковать так, как будто каждый элемент списка индивидуально идентифицируется как отдельный и уникальный элемент. Таким образом, ни один отдельный член такого списка не должен толковаться как эквивалентный де-факто любому другому члену того же списка исключительно на основании их представления в общей группе без указаний на обратное.

Кроме того, некоторые молекулы, конструкции, композиции, элементы, фрагменты, эксципиенты, нарушения, патологические состояния, свойства, стадии и т. п. могут обсуждаться в контексте одного конкретного варианта осуществления или аспекта или в отдельном абзаце или разделе данного описания. Понятно, что это делается только для удобства и краткости, и любое такое изобретение в равной степени применимо и предназначено для объединения с любыми другими вариантами осуществления или аспектами, обнаруженными где-либо в настоящем изобретении и формуле изобретения, которые все образуют заявку и заявленное изобретение на дату подачи заявки. Например, список конструкций, молекул, стадий способа, наборов или композиций, описанных в отношении конструкции, композиции или метода, предназначен и находит прямую поддержку вариантов осуществления, связанных с конструкциями, композициями, составами и способами, описанными в любой другой части данного описания, даже если эти стадии способа, активные агенты, наборы или композиции не перечислены повторно в контексте или разделе этого варианта осуществления или аспекта.

Если не указано иное, «последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и, таким образом, кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность.

Термин «расположенный на N-конце» применительно к положению первого домена или последовательности относительно второго домена или последовательности в первичной аминокислотной последовательности полипептида означает, что первый домен или последовательность расположены ближе к N-концу первичной аминокислотной последовательности полипептида, чем второй домен или последовательность. В некоторых вариантах осуществления между первым доменом или последовательностью и вторым доменом или последовательностью могут быть дополнительные последовательности и/или домены.

Термин «расположенный на C-конце» применительно к положению первого домена или последовательности относительно второго домена или последовательности в первичной аминокислотной последовательности полипептида означает, что первый домен или последовательность расположены ближе к C-концу первичной аминокислотной

последовательности полипептида, чем второй домен или последовательность. В некоторых вариантах осуществления между первым доменом или последовательностью и вторым доменом или последовательностью могут быть дополнительные последовательности и/или домены.

Термин «экзогенный» относится к любому материалу, введенному из клетки, ткани или организма или происходящему извне, который не продуцируется или не происходит из той же клетки, ткани или организма, в который он вводится.

Термин «трансдуцированный», «трансфицированный» или «трансформированный» относится к процессу, посредством которого экзогенная нуклеиновая кислота вводится или переносится в клетку. «Трансдуцированная», «трансфицированная» или «трансформированная» клетка (например, клетка млекопитающего) представляет собой клетку, которая была трансдуцирована, трансфицирована или трансформирована экзогенной нуклеиновой кислотой (например, вектором), которая включает экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую любую из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе.

Термин «нуклеиновая кислота» относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) или рибонуклеиновой кислоте (РНК) или их комбинации либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. При отсутствии специальных ограничений данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, обладающие свойствами связывания, аналогичными свойствам эталонных нуклеотидов. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно включает комплементарные последовательности наравне с явно указанными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

Модификации могут быть введены в нуклеотидную последовательность стандартными методами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и мутагенез, опосредованный полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Консервативные аминокислотные замены — это такие замены, в которых аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Эти семейства включают: аминокислоты с кислыми боковыми цепями (например, аспартат и глутамат), аминокислоты с основными боковыми

цепями (например, лизин, аргинин и гистидин), неполярные аминокислоты (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин и триптофан), незаряженные полярные аминокислоты (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин и тирозин), гидрофильные аминокислоты (например, аргинин, аспарагин, аспарат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин), гидрофобные аминокислоты (например, аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин). Другие семейства аминокислот включают: алифатические-гидроксиаминокислоты (например, серин и треонин), семейство амидов (например, аспарагин и глутамин), семейство альфатических аминокислот (например, аланин, валин, лейцин и изолейцин) и семейство ароматических аминокислот (например, фенилаланин, триптофан и тирозин).

В контексте данного документа фраза «специфически связывается» или «вступает в иммунную реакцию» означает, что активируемый антигенсвязывающий белковый комплекс реагирует с одной или более антигенными детерминантами желаемого антигена-мишени и не реагирует с другими полипептидами или связывается с гораздо более низкой аффинностью, например, около или более 10^{-6} М.

Термин «лечение» относится к ослаблению по меньшей мере одного симптома нарушения. В некоторых вариантах осуществления заболевание, которое лечат, представляет собой злокачественное новообразование и направлено на ослабление по меньшей мере одного симптома злокачественного новообразования.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **Фиг. 1–4** представлены схемы иллюстративных активируемых цитокиновых конструкций.

На **Фиг. 5** показана реакция расщепления цитокиновой конструкции без пептидной маски, IFN α -2b-hIgG4 Fc (с расщепляемым фрагментом 1204dL или расщепляемым фрагментом 1490) и протеазой (либо uPA, либо MT-SP1), которая генерирует мономерные зрелые IFN α -2b.

На **Фиг. 6A–6C** показана активация цитокиновой конструкции (ProC440) протеазами uPa и MMP14. На **Фиг. 6B** показана последовательность ProC440 (SEQ ID NO: 316) с сайтами расщепления MMP14 и uPA.

На **Фиг. 7A–7B** показана активность цитокиновой конструкции (ProC440), протестированная *in vitro* с использованием реагирующих на IFN клеток HEK293 (**Фиг. 7A**) и клеток Daudi (**Фиг. 7B**).

На **Фиг. 8** показана последовательность маскированной цитокиновой конструкции ProC732 (SEQ ID NO: 321) с необязательной сигнальной последовательностью, выделенной курсивом (SEQ ID NO: 244), последовательностью маскирующего пептида, выделенной двойным подчеркиванием, последовательностями расщепляемых фрагментов, выделенных жирным шрифтом, и подчеркнутой последовательностью зрелого IFN-альфа-2b подчеркнута.

На **Фиг. 9** показана последовательность маскированной цитокиновой конструкции без последовательности расщепляемого фрагмента между цитокином и доменом димеризации, ProC733 (SEQ ID NO: 322), с необязательной сигнальной последовательностью, выделенной курсивом (SEQ ID NO: 244), последовательностью маскирующего пептида, выделенной двойным подчеркиванием, последовательностью расщепляемого фрагмента, выделенной жирным шрифтом, и подчеркнутой последовательностью зрелого IFN-альфа-2b подчеркнута.

На **Фиг. 10A** показаны схемы цитокиновых конструкций ProC440, ProC732 и ProC733. На **Фиг. 10B** показана активность цитокиновых конструкций (ProC440, ProC732 и ProC733), протестированных с использованием клеток HEK293, чувствительных к IFN. На **Фиг. 10C** показана активность цитокиновой конструкции ProC732 (также называемой Pb-IFN-альфа-2b), протестированная с использованием клеток HEK293, чувствительных к IFN.

На **Фиг. 11A** показана схематично структура цитокиновой конструкции ProC286 и активность ProC286 по сравнению с активностью Sylatron® (пэгилированный интерферон альфа-2b) в анализе апоптоза клеток Daudi. ProC286 и Sylatron® продемонстрировали сходные уровни активности, что указывает на то, что ProC286 можно использовать в качестве суррогатного контроля Sylatron® для оценки переносимости IFN-альфа-2b в исследовании на хомяках. На **Фиг. 11B** показана схематично структура цитокиновой конструкции ProC291 и активность ProC291 по сравнению с активностью Sylatron® в анализе апоптоза клеток Daudi. ProC291 продемонстрировал значительно более низкую активность по сравнению с Sylatron® и ProC286.

На **Фиг. 12** показана специфическая активность IFN α -con (рекомбинантный интерферон альфа, не встречающийся в природе интерферон типа I); активный продукт расщепления цитокина ProC440 (ProC440+uPA); Sylatron® («PEG-IFN α 2b»); и ProC440, а также предполагаемые токсические дозы в исследовании с повышением дозы *in vivo*, например, при возрастающих дозах 0,08, 0,4, 2, 10 и 15 мг/кг («мг/кг»).

На **Фиг. 13A-13C** показаны профили потери массы тела животных в ответ на различные дозы цитокиновых конструкций ProC286, ProC440 и ProC732 или контроля

(IgG4 человека) в тестах на переносимость при различных дозировках у сирийских золотистых хомяков. На фиг. 13А показаны данные для дозировок 2 мг/кг («2 мг/кг»); На Фиг. 13В показаны данные для дозировок 10 мг/кг («10 мг/кг»); и на Фиг. 13С показаны данные для доз 15 мг/кг («15 мг/кг») каждой тестируемой конструкции. На **Фиг. 13D** показана токсичность, опосредованная INFa2b, у животных, получавших дозу немаскированного IFNa2b/Fc (ProC286), что соответствует повышенному ALP и повышенному терапевтическому индексу IFNa2b с одной маской (ProC440) и двойной маской (ProC732).

На **Фиг. 14** показаны результаты биохимического анализа (щелочная фосфатаза, аланинтрансаминаза и аспартатаминотрансфераза) у сирийских золотистых хомяков в ответ на различные дозы (2 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг) цитокиновых конструкций ProC286, ProC440 и ProC732 или контроля (человеческий IgG4) в тестах на переносимость.

На **Фиг. 15** показаны результаты гематологического анализа (количество ретикулоцитов, нейтрофилов и лейкоцитов (WBC)) у сирийских золотистых хомяков в ответ на различные дозы (2 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг) цитокиновых конструкций ProC286, ProC440 и ProC732. или контроль (человеческий IgG4) в тестах на переносимость.

На **Фиг. 16** показано влияние длины связывающей области (LR) на активность слитых белков IFN-альфа-2b-Fc без пептидной маски, как определено в анализе апоптоза клеток Daudi.

На **Фиг. 17** показана структура мышинового перекрестно-реактивного интерферона ACC ProC859 (вверху), антипролиферативные эффекты ACC ProC859 в анализе мышинных клеток меланомы B16 и активность ACC ProC859 в анализе чувствительных к IFN НЕК293.

На **Фиг. 18** схематически показана цитокиновая конструкция, включая изображение связывающей области (LR) и связывающей области маски (MLR).

На **Фиг. 19** показаны зависимые от активации эффекты ProC732 на первичные клетки человека. Верхний ряд указывает на индукцию IP-10 в миелоидных клетках в миелоидных клетках активированным ProC732, нижний ряд указывает на индукцию IFN-гамма в Т- и НК-лимфоцитах.

На **Фиг. 20** показана эффективность маскированного IFN-a2b (ProC732) *in vivo* при возрастающих концентрациях в модели ксенотрансплантата Daudi.

На **Фиг. 21** показана активация *in vitro* спленоцитов мыши с помощью IFNa-A/D (ProC1023) по сравнению с обработанной uPA нерасщепляемой маскированной конструкцией ProC1549.

На **Фиг. 22** показано влияние маскированного IFN-a2b (ProC732) и ProC732,

активированного uPA, на жизнеспособность клеток меланомы хомяка.

На **Фиг. 23А** показана противоопухолевая активность маскированного активируемого IFNa A/D (ProC1023) при 10, 50 и 200 мкг. На **Фиг. 23В** показана активация *in vivo* маскированного IFNa A/D относительно (ProC1023) нерасщепляемого маскированного IFNa A/D (ProC1549).

На **Фиг. 24А-24В** показана иммунная память в ответ на повторное введение опухолевых клеток MC38 у мышей, ранее получавших активируемый IFNa A/D (200 мкг ProC1023) (внизу, Фиг. 24В), по сравнению с введением опухолевых клеток MC38 у интактных контрольных мышей (вверху, Фиг. 24А).

На **Фиг. 25** показано сравнение зависимой от активации индукции сигнатуры интерферона типа I с использованием маскированного Pro-IFN-a2b (нерасщепленный ProC732), немаскированного IFN-a2b (обработанный uPA ProC732) или Peg-IFN-a2b (Sylatron®).

На **Фиг. 26** показана фармакокинетика INF-a2b с двойной маской (ProC732) и ProC286, ProC440 и ProC659 у хомяков.

На **Фиг. 27** показана противоопухолевая активность активируемого IFNa A/D с одной маской (ProC859) при внутриопухолевой инъекции 20 мкг и системном введении 200 мкг по сравнению с контролем PBS.

На **Фиг. 28А** показана активность ProC1023 с двойной маской по сравнению с ProC859 с одной маской в репортерном анализе IFNa в клетках меланомы мыши В16. На **Фиг. 28В** и **28С** показана активность ProC1023 по сравнению с ProC1549 в репортерном анализе IFNa в клетках меланомы мыши В16.

На **Фиг. 29** показана активность мономерного ProC1239 с двойной маской и ProC732 с двойной маской из димера, протестированная *in vitro* с использованием клеток НЕК293, чувствительных к IFN.

На **Фиг. 30** показана активность ProC732, ProC1550 и ProC1552, протестированная *in vitro* с использованием чувствительных к IFN клеток НЕК293 в нерасщепленном состоянии и после активации протеазой либо uPa, либо MTSP1.

На **Фиг. 31** показана активность рекомбинантного IFNa2b, мономерного IFNa2b (ProC657), активированного гомодимерного IFNa2b (ProC440 + uPA) и гомодимерного IFNa2b (ProC440) с использованием чувствительных к IFN НЕК293.

На **Фиг. 32** показана противоопухолевая активность ProC440 (вверху) и пегинтерферона (внизу) при возрастающих дозах.

На **Фиг. 33** показана противоопухолевая активность активируемого IFNa A/D с

двойной маской (ProC1023) по сравнению с неактивируемым IFNa A/D с двойной маской (ProC1549) в дозах 10 мкг, 50 мкг и 200 мкг.

На **Фиг. 34А** показана противоопухолевая активность ProC1023 в дозах 10, 50 и 200 мкг по сравнению с контролем PBS. На **Фиг. 34В** показана противоопухолевая активность ProC1023 по сравнению с неактивируемым IFNa A/D (ProC1549) в дозе 200 мкг.

На **Фиг. 35А** показано, что MMP восстанавливает активность NSUB (ProC649). На **Фиг. 35В** показана условная активация ProC732 и ProC1299 с помощью uPA. На **Фиг. 35С** показано сравнение IFNa2b (SEQ ID NO: 1) с IFNaAD (SEQ ID NO: 481) и то, что ProC1301 устойчив к активации по сравнению с ProC732.

На **Фиг. 36** показана активность ProC440, ProC732 и ProC1301 по подавлению роста опухоли в зависимости от концентрации.

На **Фиг. 37А-37С** показан анализ активации ProC732 опухолевыми тканями (**Фиг. 37А**) и результаты. Флуоресцентно меченный ProC732 инкубировали на срезах опухолевой ткани при 37°C. Восстановленный раствор затем анализировали с помощью капиллярного электрофореза, позволяющего количественно определять активные молекулы (**Фиг. 37С**), и с использованием репортерной модели НЕК-blue IFNA (**Фиг. 37В**). В качестве контрольных тканей использовали ферментативно неактивные образцы.

На **Фиг. 38А-38С** показаны изменения биологической активности молекул ProC732 (**Фиг. 38А**) и рекомбинантного IFN-a2b (**Фиг. 38В**) после инкубации с опухолевыми тканями, анализируемыми с помощью репортерной модели НЕК-blue IFNA. Кратность изменения биологической активности 10 нг/мл ProC732 или 1 нг/мл рекомбинантного IFN-a2b рассчитывали относительно значений на 0 ч. Биоактивность белков ProC732 и IFN-a2b, которые инкубировали в отсутствие опухолевых тканей в течение 24 ч, (**Фиг. 38С**). Каждая линия соединяет отдельный образец (диапазон концентраций 100–0,01 нг/мл), проанализированный до и после 24-часовой инкубации.

На **Фиг. 39, 40А и 40В** показана фармакокинетика маскированного INF-a2b и контрольных молекул у приматов, отличных от человека. Яванским макакам (N=2 на группу) вводили подкожно однократную дозу ProC732 в количестве 0,03, 0,3, 3 или 15 мг/кг. На **Фиг. 39** показаны результаты, когда образцы плазмы были собраны в указанные моменты времени и проанализированы с целью определения общей концентрации ProC732. На **фиг. 40А** показаны концентрации IP-10 в сыворотке, измеренные с помощью анализа MSD V-plex. На **Фиг. 40В** показаны концентрации циркулирующих в крови Pb-IFN-a2b и IP-10, нанесенные относительно друг друга на 1-й и 7-й день после введения.

На **Фиг. 41А-41D** показано связывание активированного Pb-IFN-a2b с рецепторами

интерферона альфа *in vitro*. Белки IFNAR1 человека, IFNAR2 человека, IFNAR1 яванского макака или IFNAR2 яванского макака захватывали на чипе, покрытом иммобилизованным антителом к Fc человека. Концентрации активированного IFN-a2b (ProC1640) в диапазоне от 25 нМ до 1,5625 мкМ пропускали через лиганд-захваченный чип для получения сенсограмм для многоциклового кинетики.

На **Фиг. 42А-42D** показано связывание отдельных маскированных молекул Pb-IFN-a2b с IFNAR2 человека. Лиганды захватывали на чипе, покрытом иммобилизованными антителами к Fc человека (Фиг. 42А-42В) или антителами к гистидину (Фиг. 42С-42D). Концентрации IFN-a2b (ProC1640) в диапазоне от 25 нМ до 1,5625 мкМ пропускали через лиганд-захваченный чип для получения сенсограмм для многоциклового кинетики (Фиг. 42А и 42С). Маскированные молекулы Pb-IFN-a2b (ProC440 — Фиг. 42D, ProC1976 — Фиг. 42В) в концентрациях в диапазоне от 250 нМ до 15,625 мкМ пропускали через лиганд-захваченный чип для получения сенсограмм для многоциклового кинетики.

На **Фиг. 43** и **44** показаны изменения профиля экспрессии генов, индуцированные ProC732 у приматов, отличных от человека, в зависимости от концентрации (Фиг. 43). Яванским макакам (N=2 на группу) вводили подкожно однократную дозу ProC732 в количестве 0,03, 0,3, 3 или 15 мг/кг. РВМС от получавших лечение животных собирали и анализировали с помощью массового РНК-секвенирования. Гены называли дифференциально экспрессированными, если число изменений прочтений составляло >3 (Фиг. 44).

На **Фиг. 45** показано, что ProC1023 преимущественно активирует иммунные клетки в опухолевых тканях. Через шесть дней после обработки опухоли и ткани собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Гейтировали жизнеспособные CD45+CD3+ клетки.

На **Фиг. 46** показано, что ProC732 хорошо переносится после многократного введения. Самцы сирийских золотистых хомяков (N=5) получали три еженедельных в/б введения слитых белков ProC732 или немаскированного Fc-IFN-a2b (ProC286) и отслеживали изменения массы тела и выживаемость перед введением дозы и два раза в неделю после введения дозы.

На **Фиг. 47** показано, что маскирование ProC732 ослабляет высвобождение цитокинов/хемокинов у приматов, отличных от человека.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе представлены активируемые цитокиновые конструкции (АСС),

которые проявляют пониженный уровень активности по меньшей мере одного соответствующего цитокина, но которые после подвергания условиям активации приводят к образованию цитокинового продукта, активность которого по существу восстановлена. Активируемые цитокиновые конструкции по настоящему изобретению могут быть разработаны для селективной активации при воздействии на пораженную ткань, а не на нормальную ткань. Таким образом, эти соединения способны обеспечить преимущества терапии на основе цитокинов при потенциально меньшей токсичности, связанной с некоторыми видами терапии на основе цитокинов.

Также в данном документе предложены связанные с ними промежуточные соединения, композиции, наборы, нуклеиновые кислоты и рекомбинантные клетки, а также сопутствующие способы, включая способы применения и способы получения любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе.

Изобретатели неожиданно обнаружили, что АСС, имеющие описанные в данном документе специфические элементы и ориентации структур, потенциально эффективны в отношении повышения безопасности и терапевтического индекса цитокинов при терапии, в частности, при лечении злокачественных новообразований. Хотя цитокины являются регуляторами врожденной и адаптивной иммунной системы и обладают широкой противоопухолевой активностью в доклинических моделях, их клинический успех был ограничен системной токсичностью и слабым системным воздействием на ткани-мишени. Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что АСС, имеющие описанные в данном документе специфические элементы и ориентации структур, по-видимому, снижают системную токсичность, связанную с цитокиновыми терапевтическими средствами, и улучшают нацеливание и воздействие на мишени. Таким образом, настоящее изобретение предлагает способ снижения опосредованного мишенью распределения лекарственного средства (ТМДД) для терапевтических средств на основе цитокинов путем введения субъекту АСС, имеющих определенные элементы и ориентации структур, описанные в данном документе. Таким образом, изобретение решает проблему секвестрации значительной части введенной дозы цитокина нормальными тканями, что является проблемой, которая ограничивает долю дозы, доступной в системном кровотоке для достижения тканей-мишеней, например, раковой ткани, для стандартных терапевтических средств на основе цитокинов. Цитокиновые конструкции локализуют связывание мишени с опухолевыми тканями, тем самым сохраняя эффективность, уменьшая побочные эффекты, открывая возможности для новых мишеней, улучшая терапевтическое окно для проверенных мишеней, создавая терапевтическое окно для «не поддающихся лечению»

мишеней и обеспечивая несколько модальностей связывания. В настоящем изобретении предложена безопасная и эффективная системная доставка, тем самым избегая дозозависимой токсичности видов обычной системной цитокиновой терапии, а также избегая необходимости внутриопухолевой инъекции. В настоящем изобретении предложены средства для повышения локализованной антивирусной активности, иммуномодулирующей активности, антипролиферативной активности и проапоптотической активности. Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что димеризация первой и второй мономерных конструкций приводит к сильному снижению активности цитокинов, и неожиданно обнаружили, что активность цитокинов может быть существенно снижена с очень высокой эффективностью маскирования путем добавления пептидной маски на другом конце активируемой конструкции. См., например, Фиг. 10А-10С.

Предварительная заявка США № 63/008542, поданная 10 апреля 2020 г., и предварительная заявка США № 63/161889, поданная 16 марта 2021 г., от заявителя, в которых описаны определенные активируемые цитокиновые конструкции без аффинной пептидной маски, полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Активируемые цитокиновые конструкции

Активируемые цитокиновые конструкции (АСС) по настоящему изобретению представляют собой димерные комплексы, включающие первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию. Димеризации мономерных компонентов способствует пара доменов димеризации. В одном аспекте каждая мономерная конструкция включает белок-цитокин (СР), один или более расщепляемых фрагментов (СМ), домен димеризации (DD) и пептидную маску (РМ). Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что структуры АСС, включающие как домен димеризации, так и пептидную маску, обладают улучшенной эффективностью маскирования для минимизации или устранения нецелевых эффектов и нежелательной активности и/или токсических побочных эффектов цитокинов.

В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении предложена активируемая цитокиновая конструкция (АСС), которая включает первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, где:

(а) первая мономерная конструкция содержит первую пептидную маску (РМ1), первый зрелый белок-цитокин (СР1), первый и третий расщепляемые фрагменты (СМ1 и СМ2) и первый домен димеризации (DD1),

где CM1 расположен между CP1 и DD1, а CM2 расположен между PM1 и CP1; и

(b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый белок-цитокин (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM3) и второй домен димеризации (DD2),

где CM3 расположен между CP2 и DD2;

где DD1 и DD2 связываются друг с другом, образуя таким образом димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и

при этом АСС характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция дополнительно содержит вторую пептидную маску (PM2) и четвертый расщепляемый фрагмент (CM4), расположенный между PM2 и CP2. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция идентичны и связываются друг с другом с образованием гомодимера. В других вариантах осуществления по меньшей мере один из компонентов CP, CM, PM или DD в каждой из первой и второй мономерных конструкций не идентичен, и первая и вторая мономерные конструкции связываются друг с другом с образованием гетеродимера.

Термин «активируемый», когда он используется в отношении цитокиновой конструкции, относится к цитокиновой конструкции, которая проявляет первый уровень одной или нескольких активностей, после чего воздействие условий, вызывающих расщепление одного или более расщепляемых фрагментов, приводит к образованию цитокиновой конструкции, которая проявляет второй уровень одной или более активностей, где второй уровень активности выше, чем первый уровень активности. Неограничивающие примеры активности включают любую из иллюстративных активностей цитокина, описанных в данном документе или известных в данной области техники.

Термин «зрелый белок-цитокин» относится в данном документе к белку-цитокину, в котором отсутствует сигнальная последовательность. Сигнальная последовательность также упоминается в данном документе как «сигнальный пептид». Белок-цитокин (CP) может быть зрелым белком-цитокином или белком-цитокином с сигнальным пептидом. Таким образом, в некоторых аспектах АСС по настоящему изобретению могут включать последовательность зрелого белка-цитокина. В некоторых аспектах АСС по настоящему изобретению могут включать последовательность зрелого белка-цитокина и, кроме того, сигнальную последовательность. В некоторых аспектах АСС по настоящему изобретению

могут включать последовательности, описанные в данном документе, содержащие или не содержащие сигнальные последовательности, указанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 и SEQ ID NO: 244.

Термины «расщепляемый фрагмент» и «СМ» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения пептида, аминокислотная последовательность которого содержит субстрат для специфичной к последовательности протеазы. Расщепляемые фрагменты, подходящие для применения в качестве СМ, включают любые субстраты протеаз, известные в данной области техники. Примеры расщепляемых фрагментов более подробно описаны ниже.

Термины «пептидная маска» и «РМ» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения аминокислотной последовательности из менее чем 50 аминокислот, которая снижает или ингибирует одну или более активностей белка-цитокина. РМ может связываться с цитокином и ограничивать взаимодействие цитокина с его рецептором. В некоторых вариантах осуществления РМ имеет длину не более 40 аминокислот. В предпочтительных вариантах осуществления РМ имеет длину не более 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления РМ имеет длину не более 19, 18, 17, 16 или 15 аминокислот. В некоторых аспектах РМ содержит по меньшей мере 13 аминокислот (включая любое число от 13 до 49). В некоторых аспектах РМ содержит по меньшей мере 14 аминокислот (включая любое число от 14 до 49). В некоторых аспектах РМ содержит по меньшей мере 15 аминокислот (включая любое число от 15 до 49). В определенных аспектах количество аминокислот в РМ может быть подсчитано как количество аминокислот, которые связываются с белком-цитокином. Например, РМ не включает большие полипептиды. Например, РМ не является пептидом, ассоциированным с латентностью. Например, РМ не является цитокином. Например, РМ не является рецептором цитокина. Например, РМ не является фрагментом рецептора цитокина. В некоторых аспектах РМ не имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с рецептором цитокина. Например, РМ не является альбумином. Например, РМ не включает белки или полипептиды, содержащие более 50 аминокислот. В некоторых аспектах РМ не включает белки или полипептиды, содержащие более 25 аминокислот. В некоторых аспектах РМ не включает белки или полипептиды, содержащие более 20 аминокислот. В некоторых аспектах РМ не включает белки или полипептиды, содержащие более 15 аминокислот. В некоторых аспектах РМ не включает аминокислоты, образующие гибкие N-концевые или C-концевые хвостовые области.

Термины «домен димеризации» и «DD» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения одного члена пары доменов димеризации, где каждый член пары способен связываться с другим посредством одного или более ковалентных или нековалентных взаимодействий. Первый DD и второй DD могут быть одинаковыми или разными. Иллюстративные DD, подходящие для применения в качестве DD1 и/или DD2, более подробно описаны ниже.

В контексте данного документа термин «линкер» относится к пептиду, аминокислотная последовательность которого не является субстратом для протеазы. Примеры линкеров более подробно описаны ниже.

В контексте данного документа термин «связывающая область» или «LR» относится к участку аминокислотных остатков между С-концом цитокина и аминокислотным остатком, который находится на N-конце рядом с проксимальной точкой взаимодействия между доменами димеризации (т. е. связывающая область не включает С-концевую аминокислоту цитокина или N-концевую аминокислоту DD, которая образует проксимальную точку взаимодействия с DD соответствующего второго мономера). Например, когда DD представляют собой пару доменов Fc, связывающая область представляет собой участок аминокислотных остатков между С-концом цитокина и первым N-концевым остатком цистеина Fc, который задействован в дисульфидной связи со вторым доменом Fc (например, цистеин 226 домена Fc IgG1 или IgG4 в соответствии с нумерацией EU). Когда домен димеризации не является полипептидом, тогда связывающая область представляет собой участок аминокислотных остатков, следующий за С-концом цитокина до последней аминокислоты. Например, когда DD представляют собой пару биотин-стрептавидин, связывающая область биотинсодержащего мономера представляет собой участок аминокислотных остатков между С-концом цитокина и молекулой биотина, а связывающая область стрептавидинсодержащего мономера представляет собой участок аминокислотных остатков между С-концом цитокина и молекулой стрептавидина.

В контексте данного документа термин «связывающая область маски» или «MLR» относится к участку аминокислотных остатков между РМ и СР. MLR простирается от N-конца СР к С-концу РМ. Таким образом, MLR может включать РМ, РМ и линкер или РМ и два линкера. В некоторых аспектах MLR охватывает от 15 до 22 аминокислот. В некоторых аспектах MLR охватывает от 16 до 21 аминокислоты. В некоторых аспектах MLR охватывает от 17 до 20 аминокислот. В некоторых аспектах MLR охватывает от 18 до 20 аминокислот. В некоторых аспектах MLR охватывает 15, 16, 17, 18, 18, 20, 21 или 22 аминокислоты.

В контексте данного документа термин «эффективность маскирования» относится к активности (например, EC50) нерасщепленного АСС, деленной на активность контрольного цитокина, где контрольный цитокин может быть либо продуктом расщепления АСС, либо цитокином, используемым в качестве СР АСС. АСС, имеющий пониженный уровень по меньшей мере одной активности СР1 и/или СР2, имеет эффективность маскирования, превышающую 10. В некоторых вариантах осуществления АСС, описанные в данном документе, имеют эффективность маскирования более 10, более 100, более 1000 или более 5000.

В контексте данного документа термин «спейсер» относится к аминокислотному остатку или пептиду, включенному в свободный конец зрелого АСС, например, между сигнальным пептидом и N-концом зрелого АСС. В некоторых аспектах спейсер (или «шапка») может содержать остатки глутамина (Q). В некоторых аспектах остатки в спейсере минимизируют действие аминопептидазы и/или экзопептидазы, предотвращая расщепление N-концевых аминокислот. Иллюстративные и неограничивающие спейсерные аминокислотные последовательности могут включать или состоять из любой из следующих иллюстративных аминокислотных последовательностей: QGQSGS (SEQ ID NO: 246); GQSGS (SEQ ID NO: 247); QSGS (SEQ ID NO: 248); SGS; GS; S; QGQSGQG (SEQ ID NO: 249); GQSGQG (SEQ ID NO: 251); QSGQG (SEQ ID NO: 252); SGQG (SEQ ID NO: 253); GQG; QG; G; QGQSGQ (SEQ ID NO: 254); GQSGQ (SEQ ID NO: 255); QSGQ (SEQ ID NO: 256); QGQSG (SEQ ID NO: 257); QGQS (SEQ ID NO: 258); SGQ; GQ; и Q. В некоторых вариантах осуществления спейсерные последовательности могут быть опущены.

В контексте данного документа полипептид, такой как цитокин или домен Fc, может представлять собой полипептид дикого типа (например, природный полипептид) или вариант полипептида дикого типа. Вариант может представлять собой полипептид, модифицированный с помощью замены, вставки, делеции и/или добавления одной или более аминокислот полипептида дикого типа, при условии, что вариант сохраняет основную функцию или активность полипептида дикого типа. В некоторых примерах вариант может иметь измененную (например, повышенную или пониженную) функцию или активность по сравнению с полипептидом дикого типа. В некоторых аспектах вариант может представлять собой функциональный фрагмент полипептида дикого типа. Термин «функциональный фрагмент» означает, что полипептидная последовательность (например, цитокина) может включать меньшее количество аминокислот, чем полноразмерная полипептидная последовательность, но достаточную длину полипептидной цепи для обеспечения активности (например, цитокиновой активности).

Первая и вторая мономерные конструкции могут дополнительно содержать дополнительные элементы, такие как, например, один или более линкеров и т. п. Дополнительные элементы описаны ниже более подробно. Расположение компонентов CP, CM, PM и DD в каждой из первой и второй мономерных конструкций может быть выполнено в одном и том же порядке в каждой мономерной конструкции. Компоненты CP1, CM1, PM1 и DD1 могут быть одинаковыми или разными по сравнению с соответствующими CP2, CM2, PM2 и DD2 с точки зрения, например, молекулярной массы, размера, аминокислотной последовательности компонентов CP, CM и PM (и компонентов DD в вариантах осуществления, где компоненты DD представляют собой полипептиды) и т. п. Таким образом, полученный димер может иметь симметричные или асимметричные компоненты мономерной конструкции.

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит от N- к С-концу компонентов CP и CM PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1, прямо или опосредованно (через линкер) связанный с С-концом CM1. В других вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит от С- к N-концу компонентов CP и CM, PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1, прямо или опосредованно (через линкер) связанный с С-концом CM1. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу компонентов CP и CM, PM2, CM4, CP2, PM2, CM2 и, связанные прямо или косвенно (через линкер) к С-концу CM2, DD2. В других вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит от С- к N-концу компонентов CP и CM PM2, CM4, CP2, PM2, CM2 и DD2 прямо или опосредованно (через линкер) связанный с N-концом CM2, DD2. В одном примере первая мономерная конструкция содержит первый полипептид, который содержит PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1. В одном примере вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, который содержит CP2, CM2 и DD2. В еще одном примере вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, который содержит PM2, CM4, CP2, CM2 и DD2.

В некоторых вариантах осуществления компоненты CP и DD связаны линкером, который не расщепляется протеазой. Например, компоненты CP и DD могут быть связаны с помощью последовательности нерасщепляемого субстрата (NSUB). В некоторых вариантах осуществления одна из первой и второй мономерных конструкций содержит NSUB между CP и DD, а другая содержит CM между CP и DD. В некоторых аспектах линкер может представлять собой аминокислотную субстратную последовательность, которая включает остатки глицина и серина, но не подвержена расщеплению протеазами. Примеры нерасщепляемых линкерных последовательностей включают

последовательности, описанные в патенте США № 10611845B2, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. В таких случаях CP и/или DD могут иметь сайт расщепления для протеазы.

Примеры ACC в настоящем изобретении могут быть представлены следующими формулами (в форме мономер 1/мономер 2, от N-конца к C-концу в каждом мономере)

PM1-CM3-CP1-CM1-DD1 / PM2-CM4-CP2-CM2-DD2

PM1-CM3-CP1-CM1-DD1 / CP2-CM2-DD2

DD1-CM1-CP1-CM3-PM1 / DD2-CM2-CP2-CM4-PM2

DD1-CM1-CP1-CM3-PM1 / DD2-CM2-CP2

ACC могут содержать один или более линкеров между компонентами. Например, ACC могут содержать один или более линкеров между PM и CP и/или между CP и DD. Таким образом, как используется в данном документе и если не указано иное, каждая черточка (-) между компонентами ACC представляет либо прямую связь, либо связь через один или более линкеров.

В некоторых аспектах, когда ACC имеет ориентацию N-PM-CM1-CP-CM2-DD-C, тогда весь диапазон аминокислот от N-конца ACC до N-концевой аминокислоты цитокина имеет длину от 17 до 71 аминокислоты. В некоторых аспектах, когда ACC имеет ориентацию N-DD-CM1-CP-CM2-PM-C, тогда весь диапазон аминокислот от C-конца ACC до C-концевой аминокислоты цитокина имеет длину от 17 до 71 аминокислоты.

В определенных вариантах осуществления первая и вторая мономерные конструкции ориентированы таким образом, что компоненты в каждом члене димера расположены в одном и том же порядке от N-конца к C-концу компонентов CP и CM. Схема иллюстративной ACC представлена на Фиг. 1. Со ссылкой на Фиг. 1, ACC содержит от N-конца к C-концу: (1) первую мономерную конструкцию **110**, имеющую PM1 **119**, CM3 **117**, CP1 **115**, CM1 **113**, и DD1 **111**, и; (2) вторую мономерную конструкцию **120**, необязательно имеющую PM2 **129** и CM4 **127**, CP2 **125**, CM2 **123**, и DD2 **121**; и (3) одну или более ковалентных или нековалентных связей (\leftrightarrow), связывающих первую мономерную конструкцию **110** со второй мономерной конструкцией **120**. ACC может дополнительно содержать один или более необязательных линкеров **112**, **114**, **116**, **118**, **122**, **124**, **126**, и **128** между компонентами. В одном примере DD1 **111** и DD2 **121** являются одинаковыми. В другом примере DD1 **111** и DD2 **121** являются разными.

Схема еще одного иллюстративной ACC с его компонентами, расположенными в обратной ориентации ACC, представлена на Фиг. 2. Со ссылкой на Фиг. 2, ACC содержит от N-конца к C-концу компоненты CP и CM: (1) первую мономерную конструкцию **210**,

имеющую DD1 **211**, CM1 **213**, CP1 **215**, CM3 **217**, и PM1 **219**; (2) вторую мономерную конструкцию **220**, имеющую DD2 **221**, CM2 **223**, CP2 **225**, и необязательно CM4 **227** и PM2 **229**; и (3) одну или более ковалентных или нековалентных связей ($\leftarrow\rightarrow$), связывающих первую мономерную конструкцию **210** со второй мономерной конструкцией **220**. АСС может дополнительно содержать один или более необязательных линкеров **212**, **214**, **216**, **218**, **222**, **224**, **226**, и **228** между компонентами. В одном примере DD1 **211** и DD2 **221** являются одинаковыми. В другом примере DD1 **211** и DD2 **221** являются разными.

Схема еще одного иллюстративного АСС представлена на Фиг. 3. Со ссылкой на Фиг. 3, АСС содержит от N-конца к С-концу: (1) первую мономерную конструкцию **310**, имеющую PM1 **319**, CM3 **317**, CP1 **315**, CM1 **313**, и DD1 **311**; и (2) а вторую мономерную конструкцию **320**, имеющую CP2 **325**, CM2 **323**, и DD2 **321**, и необязательно PM2 **329** и CM4 **327**. DD1 **311** и DD2 **321** являются партнерами по связыванию, например, пара лиганд/рецептор или пара антиген/антигенсвязывающий пептид, так что DD1 и DD2 ковалентно или нековалентно связаны вместе. АСС может дополнительно содержать один или более необязательных линкеров **312**, **314**, **316**, **318**, **322**, **324**, **326**, и **328** между компонентами. В одном примере DD1 **311** и DD2 **321** являются одинаковыми. В другом примере DD1 **311** и DD2 **321** являются разными.

В альтернативных аспектах один из двух фрагментов, обозначенных как CP1 **315** и CP2 **325**, представляет собой укороченный белок-цитокин, не обладающий цитокиновой активностью. Например, либо CP1, либо CP2 может представлять собой укороченный интерферон альфа-2b, содержащий первые 151 аминокислоту интерферона альфа-2b дикого типа. В альтернативных аспектах один из двух фрагментов, обозначенных как CP1 **315** и CP2 **325**, представляет собой мутированный белок-цитокин, не обладающий цитокиновой активностью. Например, CP1 или CP2 может представлять собой укороченный интерферон альфа 2b, имеющий мутацию L130P (например, SEQ ID NO: 329). В альтернативных аспектах один из двух фрагментов, обозначенных как CP1 **315** и CP2 **325**, представляет собой полипептидную последовательность, не обладающую цитокиновой активностью, например, сигнальный фрагмент и/или последовательность-«заглушку». В альтернативных аспектах первая из двух группировок, обозначенных как CP1 **315** и CP2 **325**, представляет собой полипептидную последовательность, которая с высокой аффинностью связывается со вторым из двух фрагментов, обозначенных как CP1 **315** и CP2 **325**, и снижает цитокиновую активность второй фрагмента по сравнению с контрольным уровнем второго фрагмента.

Схема другого иллюстративного АСС с его компонентами, расположенными в

обратной ориентации, представлена на Фиг. 4. Как показано на Фиг. 4, АСС содержит от N-конца к С-концу компонентов СР и СМ: (1) первую мономерную конструкцию **410**, имеющую DD1 **411**, СМ1 **413**, СР1 **415**, СМ3 **417**, и РМ1 **419**; и (2) вторую мономерную конструкцию **420**, имеющую DD2 **421**, СМ2 **423**, СР2 **425**, и необязательно СМ4 **427** и РМ2 **429**. DD1 **411** и DD2 **421** являются партнерами по связыванию, например, пара лиганд/рецептор или пара антиген/антигенсвязывающий пептид, так что DD1 и DD2 ковалентно или нековалентно связаны вместе. АСС может дополнительно содержать один или более необязательных линкеров **412**, **414**, **416**, **418**, **422**, **424**, **426**, и **428** между компонентами. В одном примере DD1 **411** и DD2 **421** являются одинаковыми. В другом примере DD1 **411** и DD2 **421** являются разными.

Было обнаружено, что структура АСС очень эффективна для снижения активности компонентов зрелых белков-цитокинов таким образом, что это не приводит к существенному снижению активности цитокинов после активации. Активность СР в АСС может быть снижена как структурой АСС (например, димерной структурой), так и пептидной маской(-ами) в АСС. В некоторых вариантах осуществления условием активации АСС, описанных в данном документе, является воздействие одной или более протеаз, которые могут диссоциировать СР как от DD, так и от РМ. Например, одна или более протеаз могут расщеплять СМ между СР и РМ и СМ между СР и DD. Как показано в примерах, активация АСС приводила к существенному восстановлению активности цитокинов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что конформация цитокиновых компонентов не была необратимо изменена в контексте АСС. Примечательно, что авторы изобретения обнаружили, что настоящая структура, использующая как домен димеризации, так и одну или более пептидных масок, обладающих специфической аффинностью связывания с белком-цитокином, по-видимому, приводит к значительному маскирующему эффекту, достигаемому по сравнению с использованием либо одной пептидной маски, либо только домена димеризации.

В АСС может использоваться любой из множества зрелых белков-цитокинов, расщепляемых фрагментов, пептидных масок и доменов димеризации в качестве СР1, СР2, СМ1, СМ2, СМ3, СМ4, РМ1, РМ2, DD1 и DD2, соответственно. Например, любой из множества белков зрелых цитокинов, известных в данной области техники, или их последовательности и/или укороченные варианты могут подходить для применения в качестве одного или обоих компонентов СР1 и СР2 АСС. Зрелые белки-цитокины, СР1 и СР2, могут быть одинаковыми или разными. В определенных конкретных вариантах осуществления СР1 и СР2 являются одними и теми же. В других вариантах осуществления

CP1 и CP2 отличаются. АСС может содержать дополнительные аминокислотные остатки на одном или обоих N- и/или C-концах CP1 и/или CP2.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 могут независимо содержать зрелый белок-цитокин, выбранный из группы: интерферон (такой как, например, интерферон альфа, интерферон бета, интерферон гамма, интерферон тау, и интерферон омега), интерлейкин (например, IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-18, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-3, IL-5, GM-CSF, IL-6, IL-11, IL-21), G-CSF, IL-12, LIF, OSM, IL-10, IL-20, IL-14, IL-16, IL-17, CD154, LT- β , TNF- α , TNF- β , 4-1BBL, APRIL, CD27, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, OX40, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, EPO α , TPO, Flt-3L, SCF, M-CSF, и MSP, и т. п., а также их последовательности и укороченные варианты. В частности, АСС для применения в комбинации может содержать IL-2, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, GM-CSF, TGF-бета, LIGHT, GITR-L, CD40L, CD27L, 4-1BB-L, OX40, OX40L. Например, последовательности таких белков включают те, что приведены в таблице 11, а дополнительные примеры последовательностей можно найти на сайте ncbi.nlm.nih.gov/protein. Укороченные варианты, подходящие для применения в АСС по настоящему изобретению, включают любой укороченный на N- или C-конце цитокин, который сохраняет цитокиновую активность. Иллюстративные укороченные варианты, используемые в данном изобретении, включают любые укороченные полипептиды цитокинов, которые известны в данной области техники (см., например, Slutzki et al., *J. Mol. Biol.* 360:1019–1030, 2006, и US 2009/0025106), а также полипептиды цитокинов, укороченные с N- и/или C-конца на от 1 до около 40 аминокислот, от 1 до около 35 аминокислот, от 1 до около 30 аминокислот, от 1 до около 25 аминокислот, от 1 до около 20 аминокислот, от 1 до около 15 аминокислот, от 1 до около 10 аминокислот, от 1 до около 8 аминокислот, от 1 до около 6 аминокислот, от 1 до около 4 аминокислот, которые сохраняют цитокиновую активность. В некоторых из предыдущих вариантов осуществления укороченный CP представляет собой укороченный с N-конца CP. В других вариантах осуществления укороченный CP представляет собой укороченный с C-конца CP. В определенных вариантах осуществления укороченный CP представляет собой укороченный с C- и N-конца CP.

В некоторых вариантах осуществления каждый из CP1 и/или CP2 независимо содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере

98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) с эталонной последовательностью цитокина, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208, и SEQ ID NO: 209. Процент идентичности последовательности относится к уровню идентичности аминокислотной последовательности между двумя или более пептидными последовательностями при выравнивании с использованием программы выравнивания последовательностей, например, набора программ BLAST, общедоступных в сети интернет на веб-сайте NCBI. См. также Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403–10, 1990. В некоторых аспектах АСС содержит мутант интерферона альфа 2b, например, молекулу интерферона альфа 2b, имеющую мутацию в положении L130, например, мутацию L130P относительно SEQ ID NO: 1 (например, SEQ ID NO: 329), в качестве СР1 или СР2. В некоторых аспектах АСС содержит мутант интерферона альфа 2b, имеющий мутацию в положениях I24, F64, I60, I63, F64, W76, I116, L117, F123 или L128, или их комбинацию. Например, мутант интерферона альфа 2b может содержать мутации I116 в Т, N или R; L128 до N, H или R; I24 на Р или Q; L117H; или L128T, или их комбинацию. В некоторых аспектах мутант

интерферона альфа 2b может содержать мутации I24Q, I60T, F64A, W76H, I116R и L128N или их подмножество. В некоторых аспектах АСС содержит в качестве одного из СР1 и СР2 укороченную молекулу интерферона альфа 2b, не обладающую цитокиновой активностью. Например, укороченный интерферон альфа-2b может состоять из 151 или менее аминокислот интерферона альфа-2b, например, из любого количества аминокислот в последовательности интерферона альфа 2b дикого типа от N к С-концу: 1–151, 1–150, 1–149, 1–148,... 1–10, 1–9, 1–8, 1–7, 1–6 или 2–151, 3–151, 4–151, 5–150, 6–149, 7–148, 8–147 или любую промежуточную последовательность аминокислот или их мутантов.

В некоторых конкретных вариантах осуществления СР1 и/или СР2 включают интерферон. Интерфероны, подходящие для использования в конструкциях по настоящему изобретению в качестве СР1 и/или СР2, включают, например, интерферон альфа, интерферон бета, интерферон гамма, интерферон омега и интерферон тау. В некоторых вариантах осуществления, когда интерферон представляет собой интерферон альфа, он может представлять собой интерферон альфа-2a, интерферон альфа-2b или интерферон альфа-n3. Другие примеры интерферона альфа включают интерферон альфа-1, интерферон альфа-4, интерферон альфа-5, интерферон альфа-6, интерферон альфа-7, интерферон альфа-8, интерферон альфа-10, интерферон альфа-13, интерферон альфа-14, интерферон альфа-16, интерферон альфа-17 и интерферон альфа-21. В некоторых вариантах осуществления интерферон представляет собой рекомбинантный или очищенный интерферон-альфа. В определенных вариантах осуществления, когда интерферон представляет собой интерферон бета, его выбирают из группы, состоящей из интерферона бета-1a и интерферона бета-1b. В некоторых вариантах осуществления СР1 и/или СР2 содержат домен IFab, который представляет собой консервативный белковый домен, обнаруженный в интерфероне альфа или интерфероне бета. Домен IFab отвечает за высвобождение цитокинов и противовирусные функции интерферонов. Примеры последовательностей IFab представлены в SEQ ID NO: 482–491. В одном примере СР1 и СР2 представляют собой разные интерфероны. В еще одном примере СР1 и СР2 представляют собой один и тот же интерферон.

В некоторых вариантах осуществления СР1 и/или СР2 проявляют(-ет) активность интерферона и включают(-ет) аминокислотную последовательность, которая имеет меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 82% идентичности, по меньшей мере 84% идентичности, по меньшей мере 86% идентичности, по меньшей мере 88% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере

98% идентичности, по меньшей мере 99% идентичности или 100% идентичности с эталонной последовательностью интерферона альфа, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 и SEQ ID NO: 105. В некоторых конкретных вариантах осуществления эталонной последовательностью интерферона-альфа является SEQ ID NO: 1 (человеческий интерферон альфа-2b). В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат зрелый альфа-интерферон, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, и SEQ ID NO: 105. В определенных вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат зрелый альфа-интерферон человека, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых из описанных выше вариантов осуществления CP1 и CP2 содержат одну и ту же аминокислотную последовательность.

В других вариантах осуществления CP1 и/или CP2 проявляют(-ет) активность интерферона и включают аминокислотную последовательность, которая имеет меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 82% идентичности, по меньшей мере 84% идентичности, по меньшей мере 86% идентичности, по меньшей мере 88% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности, по меньшей мере 99% идентичности или 100% идентичности с эталонной последовательностью интерферона бета, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, и SEQ ID NO: 109. В определенных вариантах осуществления эталонная последовательность интерферона бета представляет собой эталонную последовательность человеческого интерферона бета, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 106 и SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат зрелый бета-интерферон, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, и SEQ ID NO: 109. В некоторых из описанных выше вариантов осуществления CP1 и CP2 содержат одну и ту же аминокислотную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 проявляют(-ет) активность интерферона и включают аминокислотную последовательность, которая имеет меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 82% идентичности, по меньшей мере 84% идентичности, по меньшей мере 86% идентичности, по меньшей мере 88% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 98%

идентичности, по меньшей мере 99% идентичности или 100% идентичности с эталонной последовательностью интерферона омега, соответствующей SEQ ID NO: 110 (человеческий интерферон омега). В определенных конкретных вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат зрелый человеческий интерферон омега, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110. В некоторых из описанных выше вариантов осуществления CP1 и CP2 содержат одну и ту же аминокислотную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 проявляют(-ет) активность интерлейкина и включают аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности или 100% идентичности с эталонной последовательностью интерлейкина, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, и SEQ ID NO: 160. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит зрелый интерлейкин, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, и SEQ ID NO: 160. В некоторых из описанных выше вариантов осуществления CP1 и CP2 содержат одну и ту же аминокислотную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 проявляют(-ет) активность

интерлейкина и включают аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 % идентичности с эталонной последовательностью интерлейкина, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 111 (человеческий IL-1 альфа), SEQ ID NO: 113 (человеческий IL-1 бета), SEQ ID NO: 115 (человеческий IL-1RA), SEQ ID NO: 117 (человеческий IL-18), SEQ ID NO: 119 (человеческий IL-2), SEQ ID NO: 121 (человеческий IL-4), SEQ ID NO: 123 (человеческий IL-7), SEQ ID NO: 125 (человеческий IL-9), SEQ ID NO: 127 (человеческий IL-13), SEQ ID NO: 129 (человеческий IL-15), SEQ ID NO: 131 (человеческий IL-3), SEQ ID NO: 133 (человеческий IL-5), SEQ ID NO: 137 (человеческий IL-6), SEQ ID NO: 139 (человеческий IL-11), SEQ ID NO: 143 (человеческий IL-12 альфа), SEQ ID NO: 144 (человеческий IL-12 бета), SEQ ID NO: 151 (человеческий IL-10), SEQ ID NO: 153 (человеческий IL-20); SEQ ID NO: 155 (человеческий IL-14), SEQ ID NO: 157 (человеческий IL-16), и SEQ ID NO: 159 (человеческий IL-17). В определенных из этих вариантов осуществления CP1 и/или CP2 содержат аминокислотную последовательность из группы, состоящей из SEQ ID NO: 111 (человеческий IL-1 альфа), SEQ ID NO: 113 (человеческий IL-1 бета), SEQ ID NO: 115 (человеческий IL-1RA), SEQ ID NO: 117 (человеческий IL-18), SEQ ID NO: 119 (человеческий IL-2), SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123 (человеческий IL-7), SEQ ID NO: 125 (человеческий IL-9), SEQ ID NO: 127 (человеческий IL-13), SEQ ID NO: 129 (человеческий IL-15), SEQ ID NO: 131 (человеческий IL-3), SEQ ID NO: 133 (человеческий IL-5), SEQ ID NO: 137 (человеческий IL-6), SEQ ID NO: 139 (человеческий IL-11), SEQ ID NO: 143 (человеческий IL-12 альфа), SEQ ID NO: 144 (человеческий IL-12 бета), SEQ ID NO: 151 (человеческий IL-10), SEQ ID NO: 153 (человеческий IL-20); SEQ ID NO: 155 (человеческий IL-14), SEQ ID NO: 157 (человеческий IL-16), и SEQ ID NO: 159 (человеческий IL-17). В некоторых из описанных выше вариантов осуществления CP1 и CP2 содержат одну и ту же аминокислотную последовательность.

Количество аминокислот в последовательности используемых белков-цитокинов может варьироваться в зависимости от конкретного используемого белка-цитокина. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 включают в общей сложности от около 10 до около 700 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 400 аминокислот, от около 10

аминокислот до около 600 аминокислот, от около 300 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 300 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 300 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 300 аминокислот до около 400 аминокислот, от около 300 аминокислот до около 350 аминокислот, от около 350 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 350 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 350 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 350 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 350 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 350 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 350 аминокислот до около 400 аминокислот, от около 400 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 400 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 400 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 400 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 400 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 400 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 500 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 500 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 500 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 550 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 550 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 550 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 600 аминокислот до около 650 аминокислот, или от около 650 аминокислот до около 700 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления СР1 и/или СР2 представляет собой зрелый человеческий белок-цитокин дикого типа.

В каждой мономерной конструкции АСС может использоваться любой из множества доменов димеризации. Подходящие DD включают как полимерные (например, синтетический полимер, полипептид, полинуклеотид и т. п.), так и низкомолекулярные (неполимерные фрагменты с молекулярной массой менее около 1 килодальтон, а иногда и менее около 800 дальтон) фрагменты. Пара DD может представлять собой любую пару фрагментов, которые, как известно в данной области техники, связываются друг с другом.

Например, в некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 являются членами пары, выбранной из группы: домена sush1 из альфа-цепи рецептора IL-15 человека (IL15R α) и растворимого IL-15; барназы и барнстара; протеинкиназы A (PKA) и якорного белка А-киназы (АКАР); модулей адаптера / стыковочной метки на основе мутированных

фрагментов РНКазы I; пары антигенсвязывающих доменов (например, пары однодоменных антител); растворимых, чувствительных к N-этилмалеимиду рецепторов стыковочных белков (SNARE); модулей, основанных на взаимодействии белков синтаксина, синаптоагмина, синаптобревина, и SNAP25; однодоменного антитела (sdAb) и соответствующего эпитопа; антигенсвязывающего домена (например, одноцепочечного антитела, такого как одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), однодоменное антитело и т. п.) и соответствующего эпитопа; суперспиральных полипептидных структур (например, суперспиральных структур Fos-Jun, кислотных/основных суперспиралей, суперспиралей Glu-Lys, структур лейциновой молнии), низкомолекулярных связывающих пар, таких как биотин и авидин или стрептавидин, амин/альдегид, лектин/углевод; пары полимеров, которые могут связываться друг с другом, такой как, например, пара серо- или тиолсодержащих полимеров (например, пара доменов Fc, пара полипептидов тиолированного сывороточного альбумина человека и т. п.); и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 не являются полипептидными полимерами. Неполипептидные полимеры могут ковалентно связываться друг с другом. В некоторых примерах неполипептидные полимеры могут представлять собой серосодержащий полимер, например, серосодержащий полиэтиленгликоль. В таких случаях DD1 и DD2 могут быть ковалентно связаны друг с другом посредством одной или более дисульфидных связей.

Когда пара DD1 и DD2 являются членами пары эпитоп и антигенсвязывающий домен, эпитоп может быть природным или неприродным эпитопом. Примеры неприродных эпитопов включают, например, неприродный пептид, такой как, например, поли-His-пептид (например, His-метка и т. п.).

В определенных конкретных вариантах осуществления DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc. В контексте данного документа термин «домен Fc» относится к непрерывной аминокислотной последовательности одной тяжелой цепи иммуноглобулина, например, доменам CH2-CH3 IgG, IgA или IgD или доменам CH2-CH3-CH4 IgE или IgM. Пара доменов Fc связывается вместе, образуя область Fc иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления пара доменов Fc представляет собой пару доменов Fc человека (например, пару человеческих доменов Fc дикого типа). В некоторых вариантах осуществления человеческие домены Fc представляют собой домены Fc человеческого IgG1 (например, домены Fc человеческого IgG1 дикого типа), домены Fc человеческого IgG2 (например, домены Fc человеческого IgG2 дикого типа), домены Fc человеческого IgG3 (например, домены Fc человеческого IgG3 дикого типа) или домены Fc

человеческого IgG4 (например, домены Fc человеческого IgG4 дикого типа). В некоторых вариантах осуществления человеческие домены Fc содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) с SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления пара доменов Fc включает мутант домена Fc с выступом и мутант домена Fc с впадиной. Мутанты с выступом и впадиной могут взаимодействовать друг с другом, облегчая димеризацию. В некоторых вариантах осуществления мутанты с выступом и впадиной могут иметь одну или более аминокислотных модификаций на поверхности взаимодействия между двумя доменами Fc (например, в домене CH3). В одном примере модификации включают аминокислотную замену T366W и, необязательно, аминокислотную замену S354C в одной из тяжелых цепей антитела, а также аминокислотные замены T366S, L368A, Y407V и, необязательно, Y349C в другой одной из тяжелых цепей антитела (нумерация согласно индексу EU системы нумерации Kabat). Примеры мутантов типа «выступ» и «впадину» включают мутанты Fc SEQ ID NO: 318 и 319, а также мутанты, описанные в патенте США №№ 5731168; 7695936; и 10683368, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления домены димеризации содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) с SEQ ID NO: 318 и 319, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления DD1 и/или DD2 могут дополнительно включать фрагмент, удлиняющий период полужизни в сыворотке (например, полипептиды, которые связывают сывороточные белки, такие как иммуноглобулин (например, IgG) или сывороточный альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин (HSA)). Примеры фрагментов, удлиняющих период полужизни, включают гекса-НАТ GST (глутатион-S-трансфераза) с аффинностью к глутатиону, кальмодулин-связывающий пептид (CBP), стрептавидиновая метка, целлюлоза-связывающий домен, мальтоза-связывающий белок, S-пептидную метку, хитин-связывающую метку, иммунореактивные эпитопы, эпитопную метку, метку E2, эпитопную метку на основе HA, эпитоп Мус, эпитоп

до около 180 аминокислот, от около 80 аминокислот до около 160 аминокислот, от около 80 аминокислот до около 140 аминокислот, от около 80 аминокислот до около 120 аминокислот, от около 80 аминокислот до около 100 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 180 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 160 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 140 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 120 аминокислот, от около 120 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 120 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 120 аминокислот до около 180 аминокислот, от около 120 аминокислот до около 160 аминокислот, от около 140 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 140 аминокислот до около 180 аминокислот, от около 140 аминокислот до около 160 аминокислот, от около 160 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 160 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 180 аминокислот до около 180 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 180 аминокислот до около 200 аминокислот, или от около 200 аминокислот до около 250 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления каждый из DD1 и DD2 представляет собой домен Fc, который содержит часть шарнирной области, которая включает два остатка цистеина, домен CH2 и домен CH3. В некоторых вариантах осуществления каждый из DD1 и DD2 представляет собой домен Fc, N-конец которого представляет собой первый остаток цистеина (при чтении в направлении от N к C) в шарнирной области, который вовлечен в дисульфидную связь со вторым доменом Fc (например, цистеин 226 человеческого IgG1 или IgG4 согласно нумерации EU).

В некоторых аспектах между компонентами CP и DD и/или между компонентами CP и PM прямо или опосредованно (например, через линкер) расположен расщепляемый фрагмент, который содержит субстрат для протеазы. В некоторых вариантах осуществления каждый из CM может независимо содержать субстрат для протеазы, выбранной из группы, состоящей из ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADEMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, BACE, ренина, катепсина D, катепсина E, каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 14, катепсина A, катепсина B, катепсина C, катепсина G, катепсина K, катепсина L, катепсина S, катепсина V/L2, катепсина X/Z/P, химазы, крузипаина, DESC1, DPP-4, FAP, легумаина, отубаина-2,

эластазы, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, гранзима В, гуанидинобензоатазы, гепсина, HtrA1, нейтрофильной эластазы человека, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, KLK14, лактоферрина, марапсина, матриптазы-2, меприна, MT-SP1/матриптазы, неприлизина, NS3/4A, PACE4, плазмина, PSMA, PSA, BMP-1, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP19, MMP20, MMP23, MMP24, MMP26, MMP27, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4, tPA, тромбина, триптазы, и uPA, и любой комбинации двух или более из них.

В некоторых вариантах осуществления любой из ACC, описанных в данном документе, протеаза, которая расщепляет любой из описанных в данном документе CM, может представлять собой: ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, BACE, ренин, катепсин D, катепсин E, каспазу 1, каспазу 2, каспазу 3, каспазу 4, каспазу 5, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 8, каспазу 9, каспазу 10, каспазу 14, катепсин B, катепсин C, катепсин K, катепсин L, катепсин S, катепсин V/L2, катепсин X/Z/P, крузипаин, легумаин, отубаин-2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, KLK14, меприн, неприлизин, PSMA, BMP-1, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-24, MMP-26, MMP-27, активированный белок C, катепсин A, катепсин G, химазу, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, эластазу, гранзим В, гуанидинобензоатазу, HtrA1, нейтрофильную лиазу человека, лактоферрин, марапсин, NS3/4A, PACE4, плазмин, PSA, tPA, тромбин, триптазу, uPA, DESC1, DPP-4, FAP, гепсин, матриптазу-2, MT-SP1/матриптазу, TMPRSS2, TMPRSS3, и TMPRSS4, и любую комбинацию двух или более из них.

В некоторых вариантах осуществления любой из ACC, описанных в данной документе, протеаза выбрана из группы: uPA, легумаина, MT-SP1, ADAM17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, и MMP-14.

При ряде злокачественных новообразований отмечено повышение уровня протеаз, имеющих известные субстраты. См., например, La Roca et al., *British J. Cancer* 90(7):1414-1421, 2004. Субстраты, подходящие для применения в компонентах CM, используемых в данном документе, включают те, которые чаще встречаются в раковых клетках и тканях. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления каждый из CM независимо содержит субстрат для протеазы, которая чаще обнаруживается в пораженной ткани, связанной со злокачественным новообразованием. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование выбрано из группы: рак желудка, рак молочной железы, остеосаркома и рак пищевода. В некоторых вариантах осуществления злокачественное

новообразование представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой HER2-положительное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой саркому Капоши, волосатоклеточный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз (CML), фолликулярную лимфому, почечно-клеточный рак (RCC), меланому, нейробластому, базально-клеточную карциному, кожную Т-клеточную лимфому, аденокарциному носоглотки, рак молочной железы, рак яичников, рак мочевого пузыря, БЦЖ-резистентный немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (NMIBC), рак эндометрия, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), колоректальный рак, рак пищевода, рак желчного пузыря, глиому головы и шеи карциному, рак матки, рак шейки матки или рак яичка и т. п. В некоторых из вышеописанных вариантов осуществления компоненты CM содержат субстраты для протеаз(-ы), которые более распространены в опухолевой ткани.

В некоторых вариантах осуществления каждый из CM независимо включает(-ют) последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 – SEQ ID NO: 100, а также их С-концевые и N-концевые укороченные варианты.

В некоторых вариантах осуществления CM включает последовательность, выбранную из группы: ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54) и ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68).

В определенных вариантах осуществления CM1 и/или CM1 включают(-ет) последовательность, выбранную из группы: AQNLLGMY (SEQ ID NO: 264), LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 265), VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 266), LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 267), LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 268), ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 269), LSGRSDNHGGSGGSQLRMA (SEQ ID NO: 270), QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 271), LSGRSGNHGGSGGSQLRMA (SEQ ID NO: 272), QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 273), ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 274), а также его С-концевые и N-концевые укороченные варианты. Примеры CM также включают описанные в публикациях заявок на патенты США №№ US20160289324, US20190284283, и в публикации с номерами WO 2010/081173, WO 2015/048329, WO 2015/116933, WO 2016/118629, и WO 2020/118109, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Укороченными вариантами вышеупомянутых аминокислотных последовательностей, пригодными для использования в CM, являются любые,

сохраняющие сайт распознавания для соответствующей протеазы. Они включают С-концевые и/или N-концевые укороченные варианты, содержащие по меньшей мере 3 смежные аминокислоты вышеописанных аминокислотных последовательностей, или по меньшей мере 4, или по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7 аминокислот из вышеуказанных аминокислотных последовательностей, которые сохраняют сайт распознавания для протеазы. В определенных вариантах осуществления укороченный вариант вышеописанных аминокислотных последовательностей представляет собой аминокислотную последовательность, соответствующую любой из вышеперечисленных, но укороченную с С- и/или N-конца на от 1 до около 10 аминокислот, от 1 до около 9 аминокислот, от 1 до около 8 аминокислот, от 1 до около 7 аминокислот, от 1 до около 6 аминокислот, от 1 до около 5 аминокислот, от 1 до около 4 аминокислот или от 1 до около 3 аминокислот, и которые: (1) имеет по меньшей мере три аминокислотных остатка; и (2) сохраняет сайт распознавания для протеазы. В некоторых из предшествующих вариантов осуществления укороченный СМ представляет собой укороченный с N-конца СМ. В некоторых вариантах осуществления укороченный СМ представляет собой укороченный с С-конца СМ. В некоторых вариантах осуществления укороченный С представляет собой С- и N-концевой укороченный СМ.

В некоторых вариантах осуществления любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, СМ может содержать всего от около 3 аминокислот до около 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления СМ может содержать в общей сложности от около 3 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 3 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 3 аминокислот до около 15 аминокислот, от около 3 аминокислот до около 10 аминокислот, от около 3 аминокислот до около 5 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 15 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 10 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 15 аминокислот, от около 15 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 15 аминокислот до около 20 аминокислот, или от около 20 аминокислот до около 25 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления АСС может содержать несколько СМ, которые содержат субстраты для разных протеаз. В некоторых вариантах осуществления АСС может содержать несколько СМ, которые являются субстратами для одной и той же протеазы. В одном примере СМ (несколько СМ) между каждым СР и РМ могут быть субстратами для одной и той же протеазы, а СМ (несколько СМ) между каждым СР и DD

могут быть субстратами для одной и той же протеазы, но могут быть субстратами для другой протеазы, в отличие от CM (несколько CM) между CP и PM. В другом примере CM (несколько CM) между CP и PM и CM (несколько CM) между CP и DD могут содержать субстраты для одной и той же протеазы. В другом примере CM (несколько CM) между CP и PM могут содержать субстраты для разных протеаз. В другом примере CM (несколько CM) между CP и PM могут содержать субстраты для одной и той же протеазы. В другом примере CM (несколько CM) между CP и DD могут содержать субстраты для разных протеаз. В другом примере CM (несколько CM) между CP и DD могут содержать субстраты для одной и той же протеазы.

Первая и вторая мономерные конструкции могут содержать один или более дополнительных компонентов, включая один или более линкеров и т. п. В некоторых вариантах осуществления первый мономер может включать линкер, расположенный между CP1 и CM1. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CM1 непосредственно примыкают друг к другу в первом мономере. В некоторых вариантах осуществления первый мономер содержит линкер, расположенный между CM1 и DD1. В некоторых вариантах осуществления CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу в первом мономере. В некоторых вариантах осуществления первый мономер может включать линкер, расположенный между CP1 и CM3. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CM3 непосредственно примыкают друг к другу в первом мономере. В некоторых вариантах осуществления первый мономер может включать линкер, расположенный между CP1 и PM1. В некоторых вариантах осуществления CP1 и PM1 непосредственно примыкают друг к другу в первом мономере. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет общую длину от 1 аминокислоты до около 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CM и любые линкеры, расположенные между CP1 и DD1, имеют общую длину от 3 до 15 аминокислот, или от 3 до 10 аминокислот, или от 3 до 7 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления второй мономер содержит линкер, расположенный между CP2 и CM2. В некоторых вариантах осуществления CP2 и CM2 непосредственно примыкают друг к другу во втором мономере. В некоторых вариантах осуществления второй мономер содержит линкер, расположенный между CM2 и DD2. В некоторых вариантах осуществления CM2 (например, любой из расщепляемых фрагментов, описанных в данном документе) и DD2 (например, любой из описанных в данном документе DD) непосредственно примыкают друг к другу во втором мономере. В некоторых вариантах осуществления второй мономер может включать линкер, расположенный между CP2 и CM4. В некоторых вариантах осуществления CP2 и CM4

непосредственно примыкают друг к другу во втором мономере. В некоторых вариантах осуществления второй мономер может включать линкер, расположенный между CP2 и PM2. В некоторых вариантах осуществления CP2 и PM2 непосредственно примыкают друг к другу во втором мономере. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет общую длину от 1 аминокислоты до около 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит последовательность GGGS (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления CM и любые линкеры, расположенные между CP2 и DD2, имеют общую длину от 3 до 15 аминокислот, или от 3 до 10 аминокислот, или от 3 до 7 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления первый мономер и/или второй мономер могут содержать в общей сложности от около 50 до около 800 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 750 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 400 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 350 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 300 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 150 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 100 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 800 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 750 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 400 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 350 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 300 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 100 аминокислот до около 150 аминокислот, от около 150 аминокислот до около 800 аминокислот, от около 150 аминокислот до около 750 аминокислот, от около 150 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 150 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 150 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 150 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 150 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 150 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 150 аминокислот до около 400 аминокислот, от около 150 аминокислот до около 350

аминокислот, от около 400 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 400 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 800 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 750 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 450 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 500 аминокислот до около 800 аминокислот, от около 500 аминокислот до около 750 аминокислот, от около 500 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 500 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 500 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 500 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 550 аминокислот до около 800 аминокислот, от около 550 аминокислот до около 750 аминокислот, от около 550 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 550 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 550 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 600 аминокислот до около 800 аминокислот, от около 600 аминокислот до около 750 аминокислот, от около 600 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 650 аминокислот до около 800 аминокислот, от около 650 аминокислот до около 750 аминокислот, от около 650 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 700 аминокислот до около 800 аминокислот, от около 700 аминокислот до около 750 аминокислот, или от около 750 аминокислот до около 800 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, один или более линкеров (например, гибких линкеров) могут быть введены в активируемую цитокиновую конструкцию для обеспечения гибкости в одном или более соединениях между доменами, между фрагментами, между фрагментами и доменами, или в любых других соединениях, где линкер был бы полезен. В некоторых вариантах осуществления, где АСС предложен в виде конформационно ограниченной конструкции, может быть вставлен гибкий линкер для облегчения образования и поддержания структуры в нерасщепляемой активируемой цитокиновой конструкции. Любой из описанных в данном документе линкеров может обеспечить желаемую гибкость для облегчения ингибирования связывания мишени (например, рецептора цитокина) или для облегчения расщепления СМ протеазой. В некоторых вариантах осуществления линкеры включены в АСС, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может включать гибкий линкер, а также одну или более частей, которые придают менее гибкую структуру для обеспечения

желаемой АСС. Некоторые линкеры могут включать остатки цистеина, которые могут образовывать дисульфидные связи и снижать гибкость конструкции. Было обнаружено, что уменьшение длины линкеров или связывающей области снижает активность зрелого белка-цитокина в АСС (см., например, Фиг. 16, на которой показаны данные для АСС без пептидной аффинной маски). В большинстве случаев длина линкера определяется путем подсчета в направлении от N к C количества аминокислот от N-конца линкера, примыкающего к C-концу аминокислоты предыдущего компонента, до C-конца линкера, примыкающего к N-концу аминокислоты следующего компонента (т. е. когда длина линкера не включает ни C-концевую аминокислоту предыдущего компонента, ни N-концевую аминокислоту следующего компонента). В вариантах осуществления, в которых линкер используется на N-конце DD, который содержит домен Fc, длину линкера определяют путем подсчета количества аминокислот от N-конца линкера, примыкающего к C-концевой аминокислоте предшествующего компонента к C-концу линкера, примыкающего к первому цистеину шарнирной области Fc, которая вовлечена в дисульфидную связь со вторым доменом Fc (т. е. там, где длина линкера не включает C-концевую аминокислоту предшествующего компонента или первый цистеин шарнирной области Fc).

Как видно из настоящего описания и Фиг. 18, АСС по настоящему изобретению включают участок аминокислот между CP и проксимальной точкой взаимодействия между доменами димеризации. Этот участок аминокислот может называться связывающей областью (LR), как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления дополнительные аминокислотные последовательности могут быть расположены на N-конце или C-конце любого из доменов любой из АСС. Примеры включают, но не ограничиваются ими, нацеливающие фрагменты (например, лиганд для рецептора клетки, присутствующей в ткани-мишени) и фрагменты, увеличивающие период полужизни в сыворотке (например, полипептиды, которые связывают белки сыворотки, такие как иммуноглобулин (например, IgG) или сывороточный альбумин (например, сывороточный альбумин человека (HSA))).

В некоторых вариантах осуществления любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, линкер может включать в общей сложности от около 1 аминокислоты до около 25 аминокислот (например, от около 1 аминокислоты до около 24 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 22 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 20 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 18 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 16 аминокислот, от около 1 аминокислоты

документе, линкер включает в общей сложности около 1 аминокислоты, около 2 аминокислот, около 3 аминокислот, около 4 аминокислот, около 5 аминокислот, около 6 аминокислот, около 7 аминокислот, около 8 аминокислот, около 9 аминокислот, около 10 аминокислот, около 11 аминокислот, около 12 аминокислот, около 13 аминокислот, около 14 аминокислот, около 15 аминокислот, около 16 аминокислот, около 17 аминокислот, около 18 аминокислот, около 19 аминокислот, около 20 аминокислот, около 21 аминокислоты, около 22 аминокислот, около 23 аминокислот, около 24 аминокислот или около 25 аминокислот.

Неожиданно заявитель обнаружил, что АСС, которые не содержат каких-либо линкеров между СР и DD, демонстрируют наиболее значительное снижение цитокиновой активности относительно таковой у зрелого цитокина дикого типа по сравнению с АСС, которые включают линкеры или дополнительные последовательности в связывающей области. См., например, Фиг. 16 (показывающие данные для АСС без пептидной аффинной маски). Кроме того, конфигурация, в которой нет линкеров между СР и DD, по-прежнему обеспечивает эффективное расщепление СМ, расположенного между СР и DD. См., например, Фиг. 7А, 7В, 10А-10С. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления АСС не содержит линкеров между СР и DD, а СМ между СР и DD содержит не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления общее количество аминокислот в LR составляет не более 25 аминокислот, например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 аминокислот, или от 3 до 10 аминокислот, или от 5 до 15 аминокислот, или от 7 до 12 аминокислот, или любой диапазон или конкретное число аминокислот, выбранных из диапазона, охватываемого от 3 до 25 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, линкер может быть обогащен остатками глицина (Gly или G). В некоторых вариантах осуществления линкер может быть обогащен остатками серина (Ser или S). В некоторых вариантах осуществления линкер может быть обогащен остатками глицина и серина. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет одну или более пар остатков глицин-серин (GS) (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более пар GS). В некоторых вариантах осуществления линкер имеет одну или более последовательностей Gly-Gly-Gly-Ser (GGGS) (SEQ ID NO: 2) (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более последовательностей GGGS). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит одну или более последовательностей Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (GGGGS) (SEQ ID NO: 216) (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более последовательностей GGGGS). В

некоторых вариантах осуществления линкер содержит одну или более последовательностей Gly-Gly-Ser-Gly (GGSG) (SEQ ID NO: 229) (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более последовательностей GGSG).

В некоторых вариантах осуществления любой из ACC, описанных в данном документе, линкер включает любой из или комбинацию одного или более из: GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 210), GGGS (SEQ ID NO: 2), GGGSGGGS (SEQ ID NO: 211), GGGSGGGS (SEQ ID NO: 212), GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213), GGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 215), GGGGS (SEQ ID NO: 216), GS, GGGSGS (SEQ ID NO: 217), GGGSGGGGSGGGSGS (SEQ ID NO: 218), GGS LDPKGGGGS (SEQ ID NO: 219), PKSCDKTHTCPPAPELLG (SEQ ID NO: 220), SKYPPCPPAPEFLG (SEQ ID NO: 221), GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 222), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 223), GSTSGSGKSSEGSSTKG (SEQ ID NO: 224), и GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 225).

Неограничивающие примеры линкеров могут включать последовательность, которая имеет по меньшей мере 70% идентичности (например, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) с GGGS (SEQ ID NO: 2), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 210), GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213), GGGSGS (SEQ ID NO: 217), GGGSGGGGSGGGSGS (SEQ ID NO: 218), GGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214), GGS LDPKGGGGS (SEQ ID NO: 215), и GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226).

В некоторых вариантах осуществления линкер включает последовательность, выбранную из группы: GGS LDPKGGGGS (SEQ ID NO: 219), GGGSGGGGSGGGSGS (SEQ ID NO: 218), GGGSGS (SEQ ID NO: 217), GS, (GS)_n, (GGG)_n, (GSGG)_n (SEQ ID NO: 227) и (GGG)_n (SEQ ID NO: 228), GGSG (SEQ ID NO: 229), GGSGG (SEQ ID NO: 230), GSGSG (SEQ ID NO: 231), GSGGG (SEQ ID NO: 232), GGGSG (SEQ ID NO: 233), GSSSG (SEQ ID NO: 234), GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213), GGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214), GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226), (GGG)_n (SEQ ID NO: 216), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере единице. В некоторых вариантах осуществления линкер включает

последовательность, выбранную из группы, состоящей из: GGSLDPKGGGGS (SEQ ID NO: 219), GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 218), GGGGSGS (SEQ ID NO: 217), и GS. В некоторых вариантах осуществления любой из ACC, описанных в данном документе, линкер включает последовательность, выбранную из группы: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214), и GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226). В некоторых вариантах осуществления любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, линкер включает последовательность, выбранную из группы: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213) или GGGGS (SEQ ID NO: 216). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит последовательность GGGS (SEQ ID NO: 2). Дополнительные примеры линкеров включают перечисленные в таблице 11.

В некоторых вариантах осуществления ACC может включать одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять линкерных последовательностей (например, одинаковые или разные линкерные последовательности любой из иллюстративных линкерных последовательностей, описанных в данном документе или известны в данной области техники). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит сульфо-SIAB, SMPB и сульфо-SMPB, где линкеры реагируют с сульфгидрильными группами первичных аминов.

В некоторых вариантах осуществления любой из ACC, описанных в данном документе, ACC характеризуется снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень может представлять собой уровень активности рекомбинантного CP1 и/или CP2 (например, коммерчески доступных рекомбинантных CP1 и/или CP2, рекомбинантных CP1 и/или CP2 дикого типа и т. п.). В некоторых вариантах осуществления контрольным уровнем может быть уровень активности расщепленной (активированной) формы ACC. В определенных вариантах осуществления контрольным уровнем может быть уровень активности пэгиллированного CP1 и/или CP2.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность представляет собой аффинность связывания CP1 и/или CP2 с его родственным рецептором, определяемую с помощью поверхностного плазмонного резонанса (например, проводимого в фосфатно-солевом буфере при 25 градусах Цельсия). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна активность представляет собой уровень пролиферации клеток лимфомы. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна

активность представляет собой уровень активации пути JAK/STAT/ISGF3 в клетке лимфомы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность представляет собой уровень продукции SEAP в клетке лимфомы. В дополнительном варианте осуществления по меньшей мере одна активность CP1 и/или CP2 представляет собой уровень стимулируемой цитокинами индукции генов с использованием, например, методов РНК-секвенирования (см., например, Zimmerer et al., *Clin. Cancer Res.* 14(18):5900–5906, 2008; Hilkens et al., *J. Immunol.* 171:5255–5263, 2003).

В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 2-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 5-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 10-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 20-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 30-кратным, 40-кратным, 50-кратным, 60-кратным, 70-кратным, 80-кратным, 90-кратным, 100-кратным, 500-кратным, 1000-кратным, 2000-кратным, 3000-кратным, 5000-кратным или 5000-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 1–20-кратным снижением, 200–2000-кратным снижением, 300–2000-кратным снижением, 400–2000-кратным снижением, 500–2000-кратным снижением, 1000–2000-кратным снижением, 1500–2000-кратным снижением, 100–1500-кратным снижением, 200–1500-кратным снижением, 300–1500-кратным снижением, 400–1500-кратным снижением, 500–1500-кратным снижением, 1000–1500-кратным снижением, 100–1000-кратным снижением, 200–1000-кратным снижением, 300–1000-кратным снижением, 400–1000-кратным снижением, 500–1000-кратным снижением, 1000–5000-кратным снижением, 2000–5000-кратным снижением, 3000–5000-кратным снижением, 4000–5000-кратным снижением, 1000–4000-кратным снижением, 2000–4000-кратным снижением, 3000–4000-кратным снижением, 1000–3000-кратным снижением, 2000–3000-кратным снижением, или 1000–2000-кратным

снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2.

В некоторых вариантах осуществления контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 является активность CP1 и/или CP2, высвобождаемых из АСС после расщепления СМ протеазой(-ами) («продукт расщепления»). В некоторых вариантах осуществления контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 является активность соответствующего зрелого цитокина дикого типа (например, рекомбинантного зрелого цитокина дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления инкубация АСС с протеазой приводит к получению активированного(-ых) цитокинового(-ых) продукта(-ов), где одна или более активностей CP1 и/или CP2 активированного(-ых) цитокинового(-ых) продукта(-ов) превышают одну или более активностей CP1 и/или CP2 интактной АСС. В некоторых вариантах осуществления одна или более активностей CP1 и/или CP2 активированного(-ых) цитокинового(-ых) продукта(-ов) по меньшей мере в 1 раз превышают одну или более активностей CP1 и/или CP2 АСС. В некоторых вариантах осуществления одна или более активностей CP1 и/или CP2 активированного(-ых) цитокинового(-ых) продукта(-ов) по меньшей мере в 2 раза превышают одну или более активностей CP1 и/или CP2 АСС. В некоторых вариантах осуществления одна или более активностей CP1 и/или CP2 активированного(-ых) цитокинового(-ых) продукта(-ов) по меньшей мере в 5 раз превышают одну или более активностей CP1 и/или CP2 АСС. В некоторых вариантах осуществления одна или более активностей CP1 и/или CP2 активированного(-ых) цитокинового(-ых) продукта(-ов) по меньшей мере в 10 раз превышают одну или более активностей CP1 и/или CP2 АСС. В некоторых вариантах осуществления одна или более активностей CP1 и/или CP2 активированного(-ых) цитокинового(-ых) продукта(-ов) по меньшей мере в 20 раз превышают одну или более активностей CP1 и/или CP2 АСС. В некоторых вариантах осуществления одна или более активностей CP1 и/или CP2 активированного(-ых) цитокинового(-ых) продукта(-ов) по меньшей мере в 1–20 раз выше, 200–2000 раз выше, 300–2000 раз выше, 400–2000 раз выше, 500–2000 раз выше, 1000–2000 раз выше, 1500–2000 раз выше, 100–1500 раз выше, 200–1500 раз выше, 300–1500 раз выше, 400–1500 раз выше, 500–1500 раз выше, 1000–1500 раз выше, 100–1000 раз выше, 200–1000 раз выше, 300–1000 раз выше, 400–1000 раз выше, 500–1000 раз выше, 1000–5000 раз выше, 2000–5000 раз выше, 3000–5000 раз выше, 4000–5000 раз выше, 1000–4000 раз выше, 2000–4000 раз выше, 3000–4000 раз выше, 1000–3000 раз выше, 2000–3000 раз выше, или 1000–2000 раз выше, чем активность одного или более CP1 и/или CP2 АСС.

В некоторых вариантах осуществления АСС может включать последовательность, имеющую по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 321 или 322. В некоторых вариантах осуществления АСС может кодироваться нуклеиновой кислотой, включающей последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или на 100%) идентичности с нуклеиновой кислотой, кодирующей SEQ ID NO: 321 или 322. В некоторых аспектах АСС может включать такие последовательности, но либо без сигнальных последовательностей этих последовательностей. Сигнальные последовательности конкретно не ограничены. Некоторые неограничивающие примеры сигнальных последовательностей включают, например, SEQ ID NO: 244 и соответствующие остатки и нуклеотиды в других последовательностях или же они заменены сигнальной последовательностью из другого вида или линии клеток. Другие примеры сигнальных последовательностей включают MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 242) и MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG (SEQ ID NO: 243).

Различные иллюстративные аспекты этих активируемых цитокиновых конструкций описаны ниже и могут быть использованы в любой комбинации в способах, представленных в данном документе, без ограничения. Примеры аспектов активируемых цитокиновых конструкций и способов получения активируемых цитокиновых конструкций описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления СМ выбран для применения с определенной протеазой. Протеаза может быть продуцируемой опухолевой клеткой (например, опухолевая клетка может экспрессировать большее количество протеазы, чем здоровые ткани). В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат по меньшей мере для одной протеазы, выбранной из группы, состоящей из ADAM 17, BMP-1, цистеиновой протеазы, например, катепсина, HtrA1, легумаина, матриптазы (MT-SP1), матриксной металлопротеазы (MMP), нейтрофильной эластазы, TMPRSS, например, TMPRSS3 или TMPRSS4, тромбина и активатора плазминогена u-типа (uPA, также называемого урокиназой).

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат по меньшей мере для одной матриксной металлопротеазы (MMP). Примеры MMP включают MMP1,

MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP19, MMP20, MMP23, MMP24, MMP26, и MMP27. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для MMP9, MMP14, MMP1, MMP3, MMP13, MMP17, MMP11, и MMP19. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для MMP7. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для MMP9. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для MMP14. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для двух или более MMP. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом по меньшей мере для MMP9 и MMP14. В некоторых вариантах осуществления СМ включает два или более субстрата для одной и той же MMP. В некоторых вариантах осуществления СМ включает по меньшей мере два или более субстратов MMP9. В некоторых вариантах осуществления СМ включает по меньшей мере два или более субстратов MMP14.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для MMP и включает последовательность ISSGLSS (SEQ ID NO: 19); QNQALRMA (SEQ ID NO: 16); AQNLLGMV (SEQ ID NO: 15); STFPFGMF (SEQ ID NO: 18); PVGYTSSL (SEQ ID NO: 74); DWLYWPGI (SEQ ID NO: 75); MIAPVAYR (SEQ ID NO: 42); RPSPMWAY (SEQ ID NO: 43); WATPRPMR (SEQ ID NO: 44); FRLLDWQW (SEQ ID NO: 45); LKAAPRWA (SEQ ID NO: 76); GPSHLVLT (SEQ ID NO: 77); LPGGLSPW (SEQ ID NO: 78); MGLFSEAG (SEQ ID NO: 79); SPLPLRVP (SEQ ID NO: 80); RMHLRSLG (SEQ ID NO: 81); LAAPLGLL (SEQ ID NO: 17); AVGLLAPP (SEQ ID NO: 14); LLAPSHRA (SEQ ID NO: 82); PAGLWLDP (SEQ ID NO: 20); и/или ISSGLSS (SEQ ID NO: 73).

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для тромбина. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для тромбина и включает последовательность GPRSFGL (SEQ ID NO: 83) или GPRSFG (SEQ ID NO: 84).

В некоторых вариантах осуществления СМ включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 9); NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 10); TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 11); TSGRSANP (SEQ ID NO: 12); VAGRSMRP (SEQ ID NO: 21); VVPEGRRS (SEQ ID NO: 22); ILPRSPAF (SEQ ID NO: 23); MVLGRSLL (SEQ ID NO: 24); QGRAITFI (SEQ ID NO: 25); SPRSIMLA (SEQ ID NO: 26); и SMLRSMPL (SEQ ID NO: 27).

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для нейтрофильной эластазы. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой

субстрат для сериновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для uPA. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для лемуина. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для матриптазы. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для цистеиновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для цистеиновой протеазы, такой как катепсин.

В некоторых вариантах осуществления СМ включает последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28); ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 30); AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 275); TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 276); VHMPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 277); TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 278); AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 29); LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 70); VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 266); LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 267); LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 268); LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 279); ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 269); LSGRSDNHGGSGGSQLRMA (SEQ ID NO: 270); QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 271); LSGRSGNHGGSGGSQLRMA (SEQ ID NO: 272); QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 273), и/или ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 274).

В некоторых вариантах осуществления СМ содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит последовательность, выбранную из группы, включающей: ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), SGRSDNI (SEQ ID NO: 100) и ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68).

В некоторых аспектах ACC включает первый мономер, содержащий CP1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 101–209, CM1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5–100 и 264–308, PM1, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328–329, 323 и 331–479, CM3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5–100 и 264–308, и DD1, димеризованный со вторым мономером, содержащим CP2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 101–209, CM2, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5–100 и 264–308, PM2, выбранный из SEQ ID NO: 328–329, 323 и 331–479, CM3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5–100 и 264–308, и DD2. В некоторых аспектах ACC может включать между CP1 и CM1, между CP1 и PM1, между CP1

и СМ3, между РМ1 и СМ3 и/или между СМ1 и DD1, линкер, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 210–263, и между СР2 и СМ2, между СР2 и РМ2, между СР2 и СМ4, между РМ2 и СМ4 и/или между СМ2 и DD2, линкер, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 210–263. В некоторых аспектах РМ1 выбран для применения с СР1 в соответствии с таблицей 10, а РМ2 выбран для применения с СР2 в соответствии с таблицей 10.

В некоторых вариантах осуществления АСС включает DD1 и/или DD2, которые имеют аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления АСС включает DD1, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) с SEQ ID NO: 318 или SEQ ID NO: 319. В некоторых вариантах осуществления АСС включает DD2, который имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) с SEQ ID NO: 318 или SEQ ID NO: 319.

Один или оба мономера АСС в данном документе могут содержать одну или более пептидных масок (РМ), которые могут препятствовать связыванию СР с его партнером по связыванию (например, рецепторами). В некоторых вариантах осуществления, когда АСС не активирована, РМ в АСС предотвращает связывание СР с мишенью; но когда АСС активируется, РМ существенно или существенно не мешает связыванию СР с его партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления РМ соединен с СР с помощью СМ и необязательно одного или более линкеров, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления РМ может взаимодействовать с СР, таким образом уменьшая или ингибируя взаимодействие между СР и его партнером по

связыванию. В некоторых вариантах осуществления РМ может не связываться специфически с СР, а скорее препятствовать связыванию СР с его партнером по связыванию посредством неспецифических взаимодействий, таких как стерические затруднения. Например, РМ может быть расположен в нерасщепленном АСС таким образом, что третичная или четвертичная структура АСС позволяет РМ маскировать СР посредством взаимодействия на основе заряда, тем самым удерживая РМ на месте, чтобы препятствовать доступу партнера по связыванию к СР.

Структурные свойства РМ могут быть выбраны в соответствии с такими факторами, как минимальная аминокислотная последовательность, необходимая для вмешательства в связывание белка с мишенью, представляющая интерес пара связывания белок-белок, размер цитокина, наличие или отсутствие линкеров, и тому подобное.

РМ могут быть идентифицированы и/или дополнительно оптимизированы посредством процедуры скрининга из библиотеки кандидатов АСС, имеющих переменные РМ. Например, СР и СМ могут быть выбраны для обеспечения желаемой комбинации фермент/мишень, а аминокислотная последовательность РМ может быть идентифицирована с помощью процедуры скрининга, описанной ниже, для идентификации РМ, обеспечивающего переключаемый фенотип. Например, библиотека случайных пептидов (например, пептидов, содержащих от около 2 до около 40 аминокислот или более) может быть использована в описанных в данном документе способах скрининга для идентификации подходящего РМ. В конкретных вариантах осуществления РМ со специфической аффинностью связывания с СР можно идентифицировать с помощью процедуры скрининга, которая включает обеспечение библиотеки пептидных каркасов, состоящих из кандидатов РМ, где каждый каркас состоит из трансмембранного белка и кандидата РМ. Затем библиотеку можно привести в контакт с целым белком или его частью, таким как полноразмерный белок, природный фрагмент белка или не встречающийся в природе фрагмент, содержащий белок (также способный связывать представляющий интерес партнер по связыванию), и идентификацию одного или более кандидатов РМ, содержащих детектируемо связанный белок. Скрининг может быть проведен еще одним раундом магнитно-активируемой сортировки (MACS) или флуоресцентно-активируемой сортировки (FACS), а также определением аффинности связывания РМ по отношению к РМ и последующим определением эффективности маскирования, например, как описан в US 20200308243A1, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления РМ уникален для связанного СР. Примеры

PM включают PM, которые были специально подвергнуты скринингу на связывание связывающего домена цитокина или белкового фрагмента (например, аффинные пептидные маски). В данном документе представлены способы скрининга PM для получения PM, уникальных для цитокина, и тех, которые специфически и/или селективно связывают связывающий домен партнера по связыванию / мишени, и могут включать способы дисплея белка. В таблице 10 описаны иллюстративные PM, подходящие для применения с различными иллюстративными CP.

В некоторых вариантах осуществления, когда CP соединен с PM и в присутствии природного партнера по связыванию CP, связывание CP с партнером по связыванию отсутствует или по существу отсутствует, или связывание CP с его партнером по связыванию составляет не более 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или 50% по сравнению со связыванием CP, не связанного с PM, в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96 часов или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 дней или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев или более при измерении в анализе эффективности маскирования, например, как описано в Примере 1.

PM, предусмотренные настоящим раскрытием, могут находиться в диапазоне 1–50 аминокислот (например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 30 или 40 аминокислот, или не более 40, 30, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 аминокислот). В некоторых примерах длина PM может составлять от 8 до 15 аминокислот.

PM могут содержать генетически кодируемые или генетически не кодируемые аминокислоты. Примерами генетически не кодируемых аминокислот являются D-аминокислоты, β-аминокислоты и γ-аминокислоты, но не ограничиваются ими. В конкретных вариантах осуществления PM содержат не более 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1% генетически не кодируемых аминокислот.

Аффинность связывания цитокина с мишенью или партнером по связыванию при соединении с PM может быть в по меньшей мере 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или более раз ниже, чем аффинность связывания цитокина с его партнером по связыванию, когда он не связан с PM, или в 5–10, 10–100, 10–1000, 10–10000, 10–100000, 10–1000000, 10–10000000, 100–1000, 100–10000, 100–100000, 100–1000000, 100–10000000, 1000–10000, 1000–100000, 1000–1000000, 1000–10000000, 10000–100000, 10000–1000000, 10000–10000000, 100000–10000000 или в 100000–10000000 раз ниже, чем аффинность связывания цитокина по отношению к его партнеру по связыванию, когда он не связан с PM.

Когда цитокин связан с РМ и находится в присутствии партнера по связыванию, специфическое связывание цитокина с его партнером по связыванию может быть снижено или ингибировано по сравнению со специфическим связыванием цитокина, не связанного с РМ, с его партнером по связыванию. По сравнению со связыванием цитокина, не связанного с РМ, с его партнером по связыванию, способность цитокина связывать партнера по связыванию при соединении с РМ может быть снижена по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96 часов или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 дней или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев или более при измерении *in vivo* или в анализе эффективности маскирования, например, как показано в Примере 1, иммуносорбентном анализе *in vitro*, например, как описано в US 20200308243A1.

K_D РМ по отношению к цитокину обычно может быть больше, чем K_D цитокина по отношению к партнеру цитокина по связыванию. K_D РМ по отношению к цитокину может быть по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 100000, 1000000 или даже в 10000000 раз больше, чем K_D цитокина по отношению к его партнеру по связыванию. Альтернативно, аффинность связывания РМ с цитокином может быть, как правило, ниже, чем аффинность связывания цитокина с партнером цитокина по связыванию. Аффинность связывания РМ с цитокином может быть по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 100000, 1000000 или 10000000 раз ниже, чем аффинность связывания цитокина со своим партнером по связыванию.

В некоторых вариантах осуществления РМ содержит по меньшей мере частичную или полную аминокислотную последовательность природного партнера СР по связыванию (например, рецептора СР). РМ может быть фрагментом природного партнера по связыванию. Фрагмент может сохранять не более 95%, 90%, 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, или 20% гомологии нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности с природным партнером по связыванию.

В некоторых вариантах осуществления РМ содержит аминокислотную последовательность, которая не встречается в природе или не содержит аминокислотную последовательность природного партнера по связыванию или белка-мишени. В определенных вариантах осуществления РМ не является природным партнером по связыванию СР. РМ может быть модифицированным партнером по связыванию для СР, который содержит аминокислотные замены, которые, по меньшей мере, немного снижают аффинность и/или авидность связывания с СР. В некоторых вариантах осуществления РМ не содержит или по существу не содержит нуклеиновую кислоту или аминокислотную

последовательность, гомологичную природному партнеру СР по связыванию. В других вариантах осуществления РМ не более чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, или 80% аналогичен природному партнеру по связывания СР.

В некоторых вариантах осуществления РМ содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 328–329, 323 и 331–479. Иллюстративный РМ для применения с СР, который представляет собой интерферон, предпочтительно IFN-альфа, может содержать консенсусную последовательность: TDVDYYREWXXXXXXXXX (SEQ ID NO: 361), где X представляет собой любую аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления АСС может содержать пару РМ1 и СР1 или пару РМ2 и СР2, перечисленных в таблице 10, которая содержит примеры РМ для применения с конкретными примерами цитокинов. В некоторых примерах РМ1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323 и 331–369, и СР1 представляет собой интерферон; РМ1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323 и 331–364, а СР1 представляет собой интерферон альфа; РМ1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 362–364, и СР1 представляет собой интерферон бета; РМ1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 366–369, а СР1 представляет собой интерферон гамма; РМ1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370–374, и СР1 представляет собой IL-12; РМ1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 375–382, 469–477, 478, а СР1 представляет собой IL-15; РМ1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 383–468, 469–478, а СР1 представляет собой IL-2; или РМ1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 478 и 479, а СР1 представляет собой IL-21. В некоторых примерах РМ2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323 и 331–369, и СР2 представляет собой интерферон; РМ2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323 и 331–364, а СР2 представляет собой интерферон альфа; РМ2 содержит последовательность, выбранную из

группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 362–364, и CP2 представляет собой интерферон бета; PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 366–369, а CP2 представляет собой интерферон гамма; PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370–374, и CP2 представляет собой IL-12; PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 375–382, 469–477, 478, а CP2 представляет собой IL-15; PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 383–468, 469–478, а CP2 представляет собой IL-2; или PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 478 и 479, а CP2 представляет собой IL-21.

В некоторых вариантах осуществления PM может содержать неактивный цитокин. Например, неактивный цитокин может взаимодействовать с компонентом CP в ACC и препятствовать взаимодействию между CP и его партнером по связыванию. В одном примере неактивный цитокин может содержать мутацию, например, IFN альфа-2b с мутацией L130P (SEQ ID NO: 329). В еще одном примере неактивный цитокин может представлять собой укороченный цитокин дикого типа, например, IFN альфа-2b с аминокислотами 1–150 (SEQ ID NO: 328).

В некоторых вариантах осуществления, после разъединения с цитокином и в свободном состоянии PM может обладать биологической активностью или терапевтическим эффектом, таким как способность к связыванию. Например, свободный пептид может связываться с тем же или другим партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления свободные PM (несвязанные PM) могут оказывать терапевтический эффект, обеспечивая вторичную функцию описанных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления после отделения от цитокина и в свободном состоянии PM может преимущественно не проявлять биологическую активность. Например, в некоторых вариантах осуществления PM в свободном состоянии не вызывает иммунный ответ у субъекта.

Конъюгация с агентами

В этом изобретении также представлены способы и материалы для включения дополнительных элементов в любую из ACC, описанных в данном документе, включая, например, нацеливающий фрагмент для облегчения доставки в представляющую интерес клетку или ткань, агент (например, терапевтический агент, противоопухолевый агент), токсин или их фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС может быть конъюгирован с цитотоксическим агентом, включая, помимо прочего, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп. В некоторых вариантах осуществления любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, активируемая цитокиновая конструкция может быть конъюгирована с цитотоксическим агентом, включая, помимо прочего, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты), или радиоактивный изотоп.

Неограничивающие иллюстративные цитотоксические агенты, которые могут быть конъюгированы с любым из АСС, описанных в данном документе, включают: доластатин и его производные (например, ауристин E, AFP, монометилауристин D (MMAD), монометилауристин F (MMAF), монометилауристин E (MMAE), десметилауристин E (DMAE), ауристин F, десметилауристин F (DMAF), доластатин 16 (DmJ), доластатин 16 (Dpv), производные ауристина (например, ауристин тирамин, ауристин хинолон), майтанзиноиды (например, DM-1, DM-4), производные майтанзиноида, дуокармицин, альфа-аманитин, турбостатин, фенстатин, гидроксифенстатин, спонгистатин 5, спонгистатин 7, галистатин 1, галистатин 2, галистатин 3, галокомстатин, пирролобензимидазолы (PBI), цибростатинб, доксалиформ, аналог цемадотина (CemCH₂-SH), вариант токсина A *Pseudomonas* (PES8), вариант токсина A *Pseudomonas* (ZZ-PE38), ZJ-101, антрациклин, доксорубин, даунорубин, бриостатин, камптотецин, 7-замещенный камптотецин, 10, 11-дифторметилендиоксиамптотецин, комбретастатины, дебромоеаплизиадоксин, КаhаMide-F, дискодермолид и эктеинацидины.

Неограничивающие иллюстративные ферментативно активные токсины, которые могут быть конъюгированы с любым из АСС, описанных в данном документе, включают: дифтерийный токсин, А-цепь экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa*, А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleuriies fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca Americana* (например, PAPI, PAPII и PAP-8), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогелин, рестриктоцин, феномицин, неомицин и трихотецены.

Неограничивающие примеры противоопухолевых средств, которые могут быть конъюгированы с любой из АСС, описанных в данном документе, включают: адриамицин, церубидин, блеомицин, алкеран, велбан, онковин, фторурацил, метотрексат, тиотепа, бисантрон, новантрон, тиогуанин, прокарабизин и цитарабин.

Неограничивающие примеры противовирусных средств, которые можно конъюгировать с любой из АСС, описанных в данном документе, включают: ацикловир, VIRA-A и симметрел.

Неограничивающие примеры противогрибковых средств, которые могут быть конъюгированы с любой из АСС, описанных в данном документе, включают: нистатин.

Неограничивающие примеры конъюгируемых реагентов для обнаружения, которые могут быть конъюгированы с любой из АСС, описанных в данном документе, включают: флуоресцеин и его производные, изотиоцианат флуоресцеина (FITC).

Неограничивающие примеры антибактериальных средств, которые могут быть конъюгированы с любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, включают: аминогликозиды, стрептомицин, неомицин, канамицин, амикацин, гентамицин и тобрамицин.

Неограничивающие примеры 3-бета,16-бета,17-альфа-тригидроксихолест-5-ен-22-она 16-О-(2-О-4-метоксибензоил-бета-D-ксилопиранозил)-(1->3)-(2-О-ацетил-альфа-L-арабинопиранозид) (OSW-1), которые могут быть конъюгированы с любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, включают: s-нитробензилоксикарбонильные производные Об-бензилгуанина, ингибиторы топоизомеразы, гемиастерлин, цефалотаксин, гомохаррингтонин, димеры пирролобензодиазепина (PBD), функционализированные пирролобензодиазепены, калцихеамицины, подофилитоксины, таксаны и алкалоиды барвинка.

Неограничивающие примеры радиофармацевтических препаратов, которые можно конъюгировать с любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, включают: ^{123}I , ^{89}Zr , ^{125}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{201}Tl , ^{62}Cu , ^{18}F , ^{68}Ga , ^{13}N , ^{15}O , ^{38}K , ^{82}Rb , ^{111}In , ^{133}Xe , ^{11}C , и $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (технеций).

Неограничивающие примеры тяжелых металлов, которые могут быть конъюгированы с любой из АСС, описанных в данном документе, включают: барий, золото и платину.

Неограничивающие примеры антимикоплазменных средств, которые могут быть конъюгированы с любой из описанных в данном документе АСС, включают: тилозин, спектиномицин, стрептомицин В, ампициллин, сульфаниламид, полимиксин и хлорамфеникол.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что с любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, может быть конъюгировано большое разнообразие возможных фрагментов. Конъюгация может

включать любую химическую реакцию, которая будет связывать две молекулы, пока АСС и другой фрагмент сохраняют свою активность. Конъюгация может включать множество химических механизмов, например, ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексообразование. В некоторых вариантах осуществления предпочтительным связыванием является ковалентное связывание. Ковалентное связывание может быть достигнуто либо путем прямой конденсации существующих боковых цепей, либо путем включения внешних мостиковых молекул. Многие двухвалентные или поливалентные связывающие агенты применимы для конъюгирования с любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе. Например, конъюгация может включать органические соединения, такие как сложные тиоэфиры, карбодиимиды, сложные эфиры сукцинимиды, глутаровый альдегид, диазобензолы и гексаметилендиамины. В некоторых вариантах осуществления активируемая цитокиновая конструкция может включать или иным образом вводить один или более неприродных аминокислотных остатков для обеспечения подходящих участков для конъюгации.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, агент и/или конъюгат присоединены дисульфидными связями (например, дисульфидными связями на молекуле цистеина) к антигенсвязывающему домену. Поскольку многие злокачественные новообразования естественным образом выделяют высокие уровни глутатиона, восстанавливающего агента, глутатион, присутствующий в микроокружении раковой ткани, может разрушать дисульфидные связи и впоследствии высвобождать агент и/или конъюгат в месте доставки.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, когда конъюгат связывается со своей мишенью в присутствии комплемента в целевом сайте (например, пораженной ткани (например, раковой ткани)), амидная или сложноэфирная связь, связывающая конъюгат и/или агент с линкером, расщепляется, что приводит к высвобождению конъюгата и/или агента в его активной форме. Эти конъюгаты и/или агенты при введении субъекту будут осуществлять доставку и высвобождение конъюгата и/или агента в целевом участке (например, в пораженной ткани (например, в раковой ткани)). Эти конъюгаты и/или агенты особенно эффективны для доставки *in vivo* любого из описанных в данном документе конъюгатов и/или агентов.

В некоторых вариантах осуществления линкер не расщепляется ферментами системы комплемента. Например, конъюгат и/или агент высвобождаются без активации комплемента, поскольку активация комплемента в конечном итоге лизирует клетку-

мишень. В таких вариантах осуществления конъюгат и/или агент должны быть доставлены в клетку-мишень (например, гормоны, ферменты, кортикостероиды, нейротрансмиттеры или гены). Кроме того, линкер слабо подвержен расщеплению сывороточными протеазами, и конъюгат и/или агент медленно высвобождаются в целевом сайте.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, конъюгат и/или агент сконструирован таким образом, что конъюгат и/или агент доставляются в целевой участок (например, в больную ткань (например, в раковую ткань)), но при этом конъюгат и/или агент не высвобождается.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, конъюгат и/или агент присоединены к антигенсвязывающему домену либо непосредственно, либо через нерасщепляемый линкер. Примеры нерасщепляемых линкеров включают аминокислоты (например, D-аминокислоты), пептиды или другие органические соединения, которые можно модифицировать для включения функциональных групп, которые впоследствии можно использовать для присоединения к антигенсвязывающим доменам способами, описанными в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС включает по меньшей мере одну точку конъюгации агента. В некоторых вариантах осуществления все возможные точки конъюгации доступны для конъюгации с агентом. В некоторых вариантах осуществления одна или более точек конъюгации включают, без ограничения, атомы серы, участвующие в дисульфидных связях, атомы серы, участвующие в межцепочечных дисульфидных связях, атомы серы, участвующие в межцепочечных сульфидных связях, но не атомы серы, участвующие во внутрицепочечных дисульфидных связях, и/или атомы серы цистеина или другие аминокислотные остатки, содержащие атом серы. В таких случаях остатки могут естественным образом встречаться в структуре белковой конструкции или могут быть включены в белковую конструкцию с использованием методов, включая, помимо прочего, сайт-направленный мутагенез, химическую конверсию или неправильное включение неприродных аминокислот.

В данном описании также представлены способы и материалы для получения АСС для конъюгации. В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС модифицирован для включения одной или более межцепочечных дисульфидных связей. Например, дисульфидные связи в АСС могут подвергаться разрушению после воздействия восстанавливающего агента, такого как, без ограничений, ТСЕР, DTT или β -меркаптоэтанол. В некоторых случаях разрушение дисульфидных связей является лишь частичным. В контексте данного документа термин частичное разрушение

относится к ситуациям, когда АСС приводят в контакт с восстанавливающим агентом, и часть всех возможных мест конъюгации подвергается восстановлению (например, разрушаются не все дисульфидные связи). В некоторых вариантах осуществления активируемая цитокиновая конструкция частично восстанавливается после контакта с восстанавливающим агентом, если восстановлено менее 99% (например, менее 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или менее 5%) всех возможных сайтов конъюгации. В некоторых вариантах осуществления АСС, в которой разрушено одна или более дисульфидных связей между цепями, конъюгирована с лекарственным средством, реагирующим со свободными тиолами.

В этом описании также представлены способы и материалы для конъюгации терапевтического агента с конкретным местом на АСС. В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС модифицирована так, что терапевтические агенты могут быть конъюгированы с АСС в определенных местах на АСС. Например, АСС может быть частично восстановлена таким образом, чтобы облегчить конъюгацию с АСС. В таких случаях частичное восстановление АСС происходит таким образом, что сайты конъюгации в АСС не восстановлены. В некоторых вариантах осуществления сайт(-ы) конъюгации на АСС выбран для облегчения конъюгации агента в конкретном сайте белковой конструкции. На «уровень восстановления» АСС при обработке восстановителем могут влиять различные факторы. Например, для достижения частичного восстановления АСС с помощью описанных в данном документе методов и материалов может потребоваться оптимизация соотношения восстановителя и АСС, продолжительности инкубации, температуры инкубации и/или рН восстановительного реакционного раствора. Любая подходящая комбинация факторов (например, отношение восстанавливающего агента к АСС, продолжительность и температура инкубации с восстанавливающим агентом и/или рН восстанавливающего агента) может быть использована для достижения частичного восстановления АСС (например, общего восстановления возможных сайтов конъюгации или восстановления в конкретных сайтах конъюгации).

Эффективным соотношением восстанавливающего агента и АСС может быть любое соотношение, при котором, по меньшей мере, частично восстанавливается АСС таким образом, чтобы обеспечить конъюгацию с агентом (например, общее восстановление возможных сайтов конъюгации или восстановление в конкретных сайтах конъюгации). В некоторых вариантах осуществления соотношение восстанавливающего агента к АСС

будет находиться в диапазоне от около 20:1 до 1:1, от около 10:1 до 1:1, от около 9:1 до 1:1, от около 8:1 до 1:1, от около 7:1 до 1:1, от около 6:1 до 1:1, от около 5:1 до 1:1, от около 4:1 до 1:1, от около 3:1 до 1:1, от около 2:1 до 1:1, от около 20:1 до 1:1,5, от около 10:1 до 1:1,5, от около 9:1 до 1:1,5, от около 8:1 до 1:1,5, от около 7:1 до 1:1,5, от около 6:1 до 1:1,5, от около 5:1 до 1:1,5, от около 4:1 до 1:1,5, от около 3:1 до 1:1,5, от около 2:1 до 1:1,5, от около 1,5:1 до 1:1,5 или от около 1:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 4:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 8:1 до около 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от около 2,5:1 до 1:1.

Эффективное время инкубации и температура для обработки АСС восстанавливающим агентом могут представлять собой любое время и температуру, которые, по крайней мере, частично восстанавливают АСС таким образом, чтобы обеспечить конъюгацию агента с АСС (например, общее восстановление возможных сайтов конъюгации или восстановление в конкретных сайтах конъюгации). В некоторых вариантах осуществления время инкубации и температура для обработки АСС будут находиться в диапазоне от около 1 часа при 37°C до около 12 часов при 37°C (или любых поддиапазонах).

Эффективным рН для реакции восстановления при обработке АСС восстанавливающим агентом может быть любой рН, который, по крайней мере, частично восстанавливает АСС таким образом, чтобы обеспечить конъюгацию АСС с агентом (например, общее восстановление возможных сайтов конъюгации или восстановление в конкретных сайтах конъюгации).

Когда частично восстановленную АСС приводят в контакт с агентом, содержащим тиолы, агент может конъюгировать с межцепочечными тиолами в АСС. Агент можно модифицировать таким образом, чтобы он включал тиолы, используя тиолсодержащий реагент (например, цистеин или N-ацетилцистеин). Например, АСС может быть частично восстановлен после инкубации с восстанавливающим агентом (например, ТЕРС) в течение около 1 часа при температуре около 37 °C при желаемом соотношении восстанавливающего агента и АСС. Эффективным соотношением восстанавливающего агента и АСС может быть любое соотношение, которое частично восстанавливает по меньшей мере две

межцепочечные дисульфидные связи, расположенные в АСС, таким образом, чтобы обеспечить конъюгацию тиолсодержащего агента (например, общее восстановление возможных сайтов конъюгации или восстановление в конкретных сайтах конъюгации).

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС восстанавливается восстанавливающим агентом таким образом, чтобы избежать разрушения каких-либо внутрицепочечных дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС восстанавливают восстанавливающим агентом таким образом, чтобы избежать разрушения каких-либо внутрицепочечных дисульфидных связей и восстановить по меньшей мере одну межцепочечную дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС может также включать агент, конъюгированный с АСС. В некоторых вариантах осуществления конъюгированный агент представляет собой терапевтический агент.

В некоторых вариантах осуществления агент (например, агент, конъюгированный с активируемой цитокиновой конструкцией) представляет собой обнаруживаемый фрагмент, такой как, например, метка или другой маркер. Например, агент представляет собой или содержит радиоактивно меченую аминокислоту, одну или более биотинильных групп, которые могут быть обнаружены меченым авидином (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер, или имеющего ферментативную активность, которая может быть обнаружена оптическими или колориметрическими методами), один или более радиоизотопов или радионуклидов, одну или более флуоресцентных меток, одну или более ферментных меток и/или один или более хемилюминесцентных агентов. В некоторых вариантах осуществления детектируемые фрагменты присоединены спейсерными молекулами.

В некоторых вариантах осуществления агент (например, цитотоксический агент, конъюгированный с активируемой цитокиновой конструкцией) связан с АСС с использованием углеводного фрагмента, сульфгидрильной группы, аминогруппы или карбоксилатной группы.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, конъюгированных с агентом, агент (например, цитотоксический агент, конъюгированный с активируемой цитокиновой конструкцией) конъюгирован с АСС через линкер и/или СМ (также называемый расщепляемой последовательностью). В некоторых вариантах осуществления агент (например, цитотоксический агент, конъюгированный с

активируемой цитокиновой конструкцией) конъюгирован с цистеином или лизином в АСС. В некоторых вариантах осуществления агент (например, цитотоксический агент, конъюгированный с активируемой цитокиновой конструкцией) конъюгирован с другим остатком АСС, таким как остатки, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой тиолсодержащий линкер. Некоторые неограничивающие примеры линкера и/или СМ представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Типы расщепляемых последовательностей / СМ	Аминокислотная последовательность
<u>СМ для плазмينا</u>	
Проурокиназа	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 280) PRFRIIGG (SEQ ID NO: 281)
ТФР-β	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 282)
Плазминоген	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 283)
Стафилокиназа	SSSFDKGGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 284) SSSFDKGGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 285)
<u>СМ для фактора Ха</u>	
	IEGR (SEQ ID NO: 286) IDGR (SEQ ID NO: 287) GGSIDGR (SEQ ID NO: 288)
<u>СМ для MMP</u>	
Желатиназа А	PLGLWA (SEQ ID NO: 289)
<u>СМ для коллагеназы</u>	
Коллаген кожи телят (цепь α1 (I))	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 290)
Коллаген кожи телят (цепь α2 (I))	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 291)
Коллаген бычьего хряща (цепь α1 (II))	GIAGQ (SEQ ID NO: 292)
Коллаген печени человека (цепь α1 (III))	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 293)
α ₂ M человека	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 294)
PZP человека	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 295) AGLGVVER (SEQ ID NO: 296) AGLGISST (SEQ ID NO: 297)
α ₁ M крысы	EPQALAMS (SEQ ID NO: 298) QALAMSAI (SEQ ID NO: 299)
α ₂ M крысы	AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 300)

$\alpha_1I_3(2J)$ крысы	MDAFLESS (SEQ ID NO: 301)
$\alpha_1I_3(27J)$ крысы	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 302)
Коллагеназа фибробластов человека	SAPAVESE (SEQ ID NO: 303)
<u>(аутолитические расщепления)</u>	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 304)
	VAQFVLT (SEQ ID NO: 305)
	VAQFVLTE (SEQ ID NO: 306)
	AQFVLTEG (SEQ ID NO: 307)
	PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 308)

Специалисты в данной области техники поймут, что большое количество возможных фрагментов может быть связано с АСС по настоящему изобретению. (См., например, «Conjugate Vaccines», Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки). Как правило, эффективная конъюгация агента (например, цитотоксического агента) с АСС может быть осуществлена с помощью любой химической реакции, которая будет связывать агент с АСС, а также позволит агенту и АСС сохранить функциональность.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, конъюгированных с агентом, для конъюгации агента с АСС можно использовать множество бифункциональных связывающих белок агентов, включая, помимо прочего, N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдителил)пропионат (SPDP), иминотиоланы (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (например, диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (например, дисукцинимидилсуберат), альдегиды (например, глутаральдегид), бис-азидосоединения (например, бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (например, бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (например, толиен-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (например, 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин ризин может быть получен, как описано в Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). В некоторых вариантах осуществления для конъюгации радионуклеотида с АСС можно использовать меченный углеродом-14 хелатирующий агент 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусную кислоту (MX-DTPA). (См., например, WO94/11026).

Подходящие линкеры и См описаны в литературе. (См., например, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201–208 (1984), в которой описано использование MBS (сложный эфир М-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид). См., например, патент США № 5030719,

в котором описано использование галогенированного производного ацетилгидразида, связанного с АСС посредством олигопептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления подходящие линкеры включают: (i) EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид; (ii) SMPT (4-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)-толуол (Pierce Chem. Co., кат. (21558G); (iii) SPDP (сукцинимидил-6 [3-(2-пиридилдитио) пропионамидо] гексаноат (Pierce Chem. Co., кат. № 21651G); (iv) сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил-6 [3-(2-пиридилдитио)-пропианамид] гексаноат (Pierce Chem. Co. кат. № 2165-G); и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфо-сукцинимид: Pierce Chem. Co., кат. № 24510), конъюгированный с EDC. Дополнительные линкеры включают, но не ограничиваются ими, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB или сульфо-SPDB.

Описанные выше линкеры и СМ содержат компоненты, которые имеют разные свойства, что приводит к конъюгатам с разными физико-химическими свойствами. Например, сульфо-NHS эфиры алкилкарбоксилатов более стабильны, чем сульфо-NHS эфиры ароматических карбоксилатов. Линкеры, содержащие NHS-эфир, менее растворимы, чем сульфо-NHS эфиры. Кроме того, линкер SMPT содержит стерически затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с повышенной стабильностью. Дисульфидные связи, как правило, менее стабильны, чем другие связи, поскольку дисульфидная связь расщепляется *in vitro*, что приводит к меньшему количеству доступного конъюгата. Сульфо-NHS, в частности, может повысить стабильность сочетания с помощью карбодиимида. Сочетания с помощью карбодиимида (например, EDC) при использовании в комбинации с сульфо-NHS образуют сложные эфиры, которые более устойчивы к гидролизу, чем сложные эфир, образуемые при помощи только реакции сочетания с помощью карбодиимида.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС агент может быть конъюгирован с АСС с использованием модифицированной аминокислотной последовательности, включенной в аминокислотную последовательность АСС. Вставка аминокислот, способных к конъюгации, в определенные места аминокислотной последовательности АСС позволяет сконструировать белковую конструкцию для контролируемого размещения и/или дозирования конъюгированного агента (например, цитотоксического агента). Например, АСС можно модифицировать, включив в него аминокислотный остаток цистеина в положениях первого мономера, второго мономера, третьего мономера и/или четвертого мономера, которые обеспечивают реакционноспособные тиоловые группы и не оказывают отрицательного влияния на

фолдинг белка и/или сборку белка, а также не изменяют антигенсвязывающие свойства. В некоторых вариантах осуществления АСС может быть модифицирован для включения одного или более неприродных аминокислотных остатков в аминокислотную последовательность АСС для обеспечения подходящих сайтов для конъюгации. В некоторых вариантах осуществления АСС может быть модифицирован для включения ферментативно активируемых пептидных последовательностей в аминокислотную последовательность АСС.

Нуклеиновые кислоты

В данном документе представлены нуклеиновые кислоты, включающие последовательности, которые кодируют первую мономерную конструкцию (или белковую часть первой мономерной конструкции) (например, любую из первых мономерных конструкций, описанных в данном документе) и вторую мономерную конструкцию (или белковую часть второй мономерной конструкции) (например, любую из вторых мономерных конструкций, описанных в данном документе) любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления пара нуклеиновых кислот вместе кодирует первую мономерную конструкцию (или белковую часть первой мономерной конструкции) и вторую мономерную конструкцию (или белковую часть второй мономерной конструкции). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первую мономерную конструкцию (или белковую часть первой мономерной конструкции), имеет по меньшей мере 70% идентичности (например, по меньшей мере 72% идентичности, по меньшей мере 74% идентичности, по меньшей мере 76% идентичности, по меньшей мере 78% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 82% идентичности, по меньшей мере 84% идентичности, по меньшей мере 86% идентичности, по меньшей мере 88% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности, по меньшей мере 99% идентичности или 100% идентичности) с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую мономерную конструкцию (или белковую часть второй мономерной конструкции).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая белковую часть первой мономерной конструкции, кодирует полипептид, содержащий фрагменты РМ1, СР1, СМ1 и СМ3. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая белковую часть второго мономера, кодирует полипептид, содержащий

фрагменты CP2 и CM2. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая белковую часть второго мономера, кодирует полипептид, содержащий фрагменты CP2, CM2, PM2 и CM4. В некоторых вариантах осуществления пара нуклеиновых кислот вместе кодирует белковую часть первой мономерной конструкции и белковую часть второй мономерной конструкции, при этом белковые части затем конъюгируют с фрагментами DD1 и DD2, соответственно, (на последующем этапе конъюгации).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая первую мономерную конструкцию, кодирует полипептид, содержащий фрагмент DD1. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая вторую мономерную конструкцию, кодирует полипептид, содержащий фрагмент DD2.

Векторы

В данном документе представлены векторы и наборы векторов, включающие любую из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе. Специалист в данной области техники сможет выбрать подходящие векторы или наборы векторов (например, векторы экспрессии) для получения любой из АСС, описанных в данном документе, и использовать векторы или наборы векторов для экспрессии любой из описанных в данном документе АСС. Например, при выборе вектора или набора векторов необходимо учитывать клетку, поскольку может потребоваться, чтобы вектор(-ы) был способен интегрироваться в хромосому клетки и/или реплицироваться в ней. Примеры векторов, которые можно использовать для получения АСС, также описаны ниже.

В контексте данного документа термин «вектор» относится к полинуклеотиду, способному индуцировать экспрессию рекомбинантного белка (например, первого или второго мономера) в клетке (например, любой из клеток, описанных в данном документе). «Вектор» способен доставлять нуклеиновые кислоты и их фрагменты в клетку-хозяин и включает регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер, поли(А)-сигнал). Экзогенные полинуклеотиды могут быть вставлены в вектор экспрессии для экспрессии. Термин «вектор» также включает искусственные хромосомы, плазмиды, ретровирусы и бакуловирусные векторы.

Способы конструирования подходящих векторов, которые включают любую из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, и пригодных для трансформации клеток (например, клеток млекопитающих), хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al., Eds. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd Ed., Cold

Spring Harbor Press, 1989 and Ausubel et al., Eds. "Current Protocols in Molecular Biology," Current Protocols, 1993.

Неограничивающие примеры векторов включают плазмиды, транспозоны, космиды и вирусные векторы (например, любые аденовирусные векторы (например, векторы pSV или pCMV), векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусные векторы и ретровирусные векторы) и любые векторы Gateway®. Вектор может, например, содержать достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой млекопитающего-хозяина или в системе экспрессии *in vitro*. Специалисты смогут выбрать подходящие векторы и клетки млекопитающих для получения любой из описанных в данном документе АСС.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС может быть получен биосинтетически с использованием технологии рекомбинантной ДНК и экспрессии в эукариотических или прокариотических видах.

В некоторых вариантах осуществления вектор включает нуклеиновую кислоту, кодирующую первый мономер и второй мономер любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления пара векторов вместе включает пару нуклеиновых кислот, которые вместе кодируют первый мономер и второй мономер любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления пара векторов представляет собой пару векторов экспрессии.

Клетки

Также в данном документе предложены клетки-хозяева, включающие любой из векторов или наборов векторов, описанных в данном документе, включая любую из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Любая из АСС, описанных в данном документе, может продуцироваться любой клеткой (например, клеткой млекопитающего). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего (например, клетку человека), клетку грызуна (например, клетку мыши, клетку крысы, клетку хомяка или клетку морской свинки) или клетку примата, отличного от человека.

Способы введения нуклеиновых кислот и векторов (например, любого из векторов или любого из наборов векторов, описанных в данном документе) в клетку известны в данной области техники. Неограничивающие примеры способов, которые можно

использовать для введения нуклеиновой кислоты в клетку, включают: липофекцию, трансфекцию, трансфекцию фосфатом кальция, трансфекцию катионным полимером, вирусную трансдукцию (например, аденовирусную трансдукцию, лентивирусную трансдукцию), трансфекцию наночастицами и электропорацию.

В некоторых вариантах осуществления стадия введения включает введение в клетку вектора (например, любого из векторов или наборов векторов, описанных в данном документе), включающего нуклеиновую кислоту, кодирующую мономеры, составляющие любую из АСС, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов клетка может быть эукариотической клеткой. В контексте данного документа термин «эукариотическая клетка» относится к клетке, имеющей отчетливое мембраносвязанное ядро. Такие клетки могут включать, например, клетки млекопитающих (например, грызунов, приматов, отличных от человека, или человека), насекомых, грибов или клеток растений. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой дрожжевую клетку, такую как *Saccharomyces cerevisiae*. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку высших эукариот, такой как клетки млекопитающих, птиц, растений или насекомых. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (СНО) и клетки почек эмбриона человека (например, клетки НЕК293).

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую первый мономер и второй мономер любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит пару нуклеиновых кислот, которые вместе кодируют первый мономер и второй мономер любой из АСС, описанных в данном документе.

Способы получения активируемых цитокиновых конструкций

В данном документе предложены способы получения любых АСС, описанных в данном документе, которые включают: (а) культивирование любых рекомбинантных клеток-хозяев, описанных в данном документе, в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для получения АСС; и (b) выделение АСС из клетки-хозяина и/или жидкой культуральной среды.

Способы культивирования клеток хорошо известны в данной области техники. Клетки можно поддерживать *in vitro* в условиях, которые благоприятствуют клеточной пролиферации, клеточной дифференцировке и клеточному росту. Например, клетки можно

культивировать путем приведения в контакт клетки (например, любой из клеток, описанных в данном документе) со средой для культивирования клеток, которая включает необходимые факторы роста и добавки, достаточные для поддержания жизнеспособности и роста клеток.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, способ дополнительно включает выделение выделенной АСС. Неограничивающие примеры способов выделения включают: осаждение сульфатом аммония, осаждение полиэтиленгликолем, эксклюзионную хроматографию, лиганд-аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию (например, анионную или катионную) и хроматографию гидрофобного взаимодействия.

В некоторых вариантах осуществления клетки могут продуцировать белковую часть первой мономерной конструкции, которая включает СР1, СМ1, РМ2 и СМ3, и белковую часть второй мономерной конструкции, которая включает СР2 и СМ2, и необязательно РМ2 и СМ4, а затем белковые части последовательно конъюгируют с фрагментами DD1 и DD2, соответственно.

Композиции и способы, описанные в данном документе, могут включать применение невозстанавливающих или частично восстанавливающих условий, которые позволяют образовывать дисульфидные связи между доменами димеризации для образования и поддержания димеризации АСС.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, способ дополнительно включает составление фармацевтической композиции на основе выделенной АСС. Различные составы известны в данной области техники и описаны в данном документе. Любой из выделенных АСС, описанных в данном документе, можно приготовить для любого пути введения (например, внутривенного, внутриопухолевого, подкожного, внутрикожного, перорального (например, ингаляция), чрескожного (например, местного), чресслизистого или внутримышечного).

В данном документе также представлены АСС, полученные любым из способов, описанных в данном документе. Также предложены композиции (например, фармацевтические композиции), которые включают любые АСС, полученные любым из способов, описанных в данном документе. Также в данном документе предложены наборы, которые включают по меньшей мере одну дозу любой из композиций (например, фармацевтических композиций), описанных в данном документе.

Способы лечения

В данном документе предложены способы лечения заболевания (например, злокачественного новообразования (например, любого из видов злокачественных новообразований, описанных в данном документе)) у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из АСС, описанных в данном документе.

В контексте данного документа термин «субъект» относится к любому млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное из семейства кошачьих (например, кошка), животное из семейства псовых (например, собака), лошадь (например, лошадь), кролик, свинью, грызуна (например, мышь, крысу, хомяк или морскую свинку), примат, отличный от человека, (например, представитель обезьянообразных (например, обезьяну (например, бабуин, мартышку) или человекообразную обезьяну (например, шимпанзе, гориллу, орангутанг или гиббон)) или человек. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта ранее было выявлено или диагностировано заболевание (например, злокачественное новообразование (например, любой из злокачественных новообразований, описанных в данном документе)).

В контексте данного документа термин «лечить» включает уменьшение степени тяжести, частоты или количества одного или более (например, 1, 2, 3, 4 или 5) симптомов или проявлений заболевания (например, злокачественного новообразования (например, любой из описанных в данном документе злокачественных новообразований)) у субъекта (например, у любого из субъектов, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления, когда заболевание представляет собой злокачественное новообразование, лечение приводит к уменьшению роста злокачественного новообразования, ингибированию прогрессирования злокачественного новообразования, ингибированию метастазирования злокачественного новообразования или снижению риска рецидива злокачественного новообразования у субъекта, страдающего злокачественным новообразованием.

В некоторых вариантах осуществления способы и применения по настоящему изобретению включают любой путь введения, включая внутривенный, инфузионный, внутриопухолевый, подкожный, внутрибрюшинный, интрадермальный, пероральный (например, ингаляцию), интраназальный, трансдермальный (например, местный), через слизистую оболочку и/или внутримышечный.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов заболевание представляет собой злокачественное новообразование. В данном

документе также предложены способы лечения субъекта, нуждающегося в этом (например, любого из иллюстративных субъектов, описанных в данном документе или известных в данной области техники), которые включают введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из АСС, описанных в данном документе, или любой из композиций. (например, фармацевтических композиций), описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления этих способов у субъекта идентифицировано или диагностировано злокачественное новообразование. Неограничивающие примеры злокачественного новообразования включают: солидную опухоль, гематологическую опухоль, саркому, остеосаркому, глиобластому, нейробластому, меланому, рабдомиосаркому, саркому Юинга, остеосаркому, В-клеточные новообразования, множественную миелому, лимфому (например, В-клеточную лимфому, В-клеточную неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, кожную Т-клеточную лимфому), лейкоз (например, волосатоклеточный лейкоз, хронический лимфолейкоз (CLL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз (CML), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL)), миелодиспластические синдромы (MDS), саркому Капоши, ретинобластому, рак желудка, уротелиальную карциному, рак легкого, почечно-клеточный рак, рак желудка и пищевода, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак головного мозга, рак толстой кишки, рак костей, рак легкого, рак молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы (TNBC), колоректальный рак, рак яичников, аденокарциному носоглотки, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), плоскоклеточный рак головы и шеи, рак эндометрия, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак печени, и гепатоцеллюлярную карциному. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой лимфому. В некоторых вариантах осуществления лимфома представляет собой лимфому Беркитта. В некоторых аспектах у субъекта были идентифицированы или диагностированы наследственные раковые синдромы, такие как синдром Ли Фраумени, синдромы наследственного рака молочной железы и яичников (мутации BRCA1 или BRAC2) и другие. Описанные способы также применимы при лечении несолидных злокачественных новообразований. Типичные солидные опухоли включают злокачественные новообразования (например, саркомы, аденокарциномы и карциномы) различных систем органов, таких как опухоли легкого, молочной железы, лимфоидной ткани, желудочно-кишечного тракта (например, толстой кишки) и мочеполовой системы (например, опухоли почек, уротелия или яичек), глотки, предстательной железы и яичников. Иллюстративные аденокарциномы включают колоректальный рак, почечно-клеточный рак, рак печени,

немелкоклеточный рак легкого и рак тонкой кишки.

Иллюстративные злокачественные новообразования, описанные Национальным институтом рака, включают: острый лимфобластный лейкоз взрослых; острый лимфобластный лейкоз детского возраста; острый миелоидный лейкоз взрослых; аденокарциному; аденокарциному детского возраста; СПИД-ассоциированную лимфому; злокачественные новообразования, связанные со СПИДом; анальный рак; церебеллярную астроцитому детского возраста; церебральную астроцитому детского возраста; рак внепеченочных желчных протоков; рак мочевого пузыря; рак мочевого пузыря детского возраста; рак кости, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому; глиому ствола мозга детского возраста; опухоль головного мозга взрослых; опухоль головного мозга, глиому ствола мозга детского возраста; опухоль головного мозга, мозжечковую астроцитому детского возраста; опухоль головного мозга, церебральную астроцитому/злокачественную глиому детского возраста; опухоль головного мозга, эпендимому детского возраста; опухоль головного мозга, медуллобластому детского возраста; опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли детского возраста; опухоль головного мозга, глиому зрительного пути и гипоталамуса детского возраста; опухоль головного мозга детского возраста (другое); рак молочной железы; рак молочной железы и беременность; рак молочной железы детского возраста; рак молочной железы у мужчин; бронхиальные аденомы/карциноиды детского возраста; карциноидную опухоль детского возраста; карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта; карциному коры надпочечников; карциному из островковых клеток; карциному неизвестного первичного происхождения; лимфому центральной нервной системы, первичную; мозжечковую астроцитому детского возраста; церебральную астроцитому/злокачественную глиому детского возраста; рак шейки матки; злокачественные новообразования детского возраста; хронический лимфолейкоз; хронический миелогенный лейкоз; хронические миелопролиферативные заболевания; светлоклеточную саркому сухожильных влагалищ; рак толстой кишки; колоректальный рак детского возраста; Т-клеточную лимфому кожи; рак эндометрия; эпендимому детского возраста; эпителиальный рак яичников; рак пищевода; рак пищевода детского возраста; семейство опухолей Юинга; экстракраниальную опухоль зародышевых клеток детского возраста; внегонадную опухоль зародышевых клеток; рак внепеченочных желчных протоков; рак глаза, внутриглазную меланому; рак глаза, ретинобластому; рак желчного пузыря; рак желудка (желудочный); рак желудка (желудочный) детского возраста; желудочно-кишечную карциноидную опухоль; опухоль зародышевых клеток,

внечерепную, детского возраста; опухоль зародышевых клеток, экстраганальную; опухоль зародышевых клеток яичников; гестационную трофобластическую опухоль; глиому ствола головного мозга детского возраста; глиому зрительного пути и гипоталамус детского возраста; волосатоклеточный лейкоз; рак головы и шеи; гепатоцеллюлярный рак (печени) взрослых (первичный); гепатоцеллюлярный рак (печени) детского возраста (первичный); лимфому Ходжкина взрослых; лимфому Ходжкина детского возраста; лимфома Ходжкина во время беременности; гипотарингеальный рак; глиому гипоталамуса и зрительного пути детского возраста; внутриглазную меланому; карциному островковых клеток (эндокринная поджелудочная железа); саркому Капоши; рак почки; рак гортани; рак гортани детского возраста; лейкоз, острый лимфобластный лейкоз взрослых; острый лимфобластный лейкоз детского возраста; острый миелоидный лейкоз взрослых; острый миелоидный лейкоз детского возраста; лейкоз, хронический лимфоцитарный; лейкоз, хронический миелогенный; лейкоз, волосатоклеточный; рак губы и полости рта; рак печени взрослых (первичный); рак печени детского возраста (первичный); рак легкого, немелкоклеточный; рак легкого, мелкоклеточный; острый лимфобластный лейкоз взрослых; лимфобластный лейкоз, острый детского возраста; лимфоцитарный лейкоз, хронический; лимфому, связанную со СПИДом; лимфому центральной нервной системы (первичная); Т-клеточную лимфому кожи; лимфому Ходжкина взрослых; лимфому Ходжкина детского возраста; лимфому Ходжкина во время беременности; лимфому, неходжкинскую взрослых; лимфому, неходжкинскую болезнь детского возраста; лимфому, неходжкинскую болезнь во время беременности; первичную лимфому центральной нервной системы; макроглобулинемию, болезнь Вальденстрема; рак молочной железы у мужчин; злокачественную мезотелиому взрослых; злокачественную мезотелиому детского возраста; злокачественную тимому; медуллобластому детского возраста; меланому; внутриглазную меланому; карциному из клеток Меркеля; злокачественную мезотелиому; оккультный первичный метастатический плоскоклеточный рак шеи; синдром множественной эндокринной неоплазии детского возраста; множественную миелому/плазмноклеточное новообразование; грибковидный микоз; миелодиспластические синдромы; миелогенный лейкоз, хронический; острый миелоидный лейкоз детского возраста; множественную миелому; хронические миелолиферативные заболевания; рак полости носа и придаточных пазух носа; рак носоглотки; рак носоглотки детского возраста; нейробластому; неходжкинскую лимфому взрослых; неходжкинскую лимфому детского возраста; неходжкинскую лимфому во время беременности; немелкоклеточный рак легкого; рак ротовой полости детского возраста; полости рта и рака губы; рак ротоглотки;

остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости; рак яичников детского возраста; эпителиальный рак яичников; опухоль зародышевых клеток яичников; пограничную опухоль яичника; рак поджелудочной железы; рак поджелудочной железы детского возраста; рак поджелудочной железы из островковых клеток; рак придаточных пазух носа и полости носа; рак паращитовидной железы; рак полового члена; феохромоцитому; пинеальные и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли детского возраста; опухоль гипофиза; плазмноклеточное новообразование/множественную миелому; плевропульмональную бластому; беременность и рак молочной железы; беременность и лимфому Ходжкина; беременность и неходжкинскую лимфому; первичную лимфому центральной нервной системы; первичный рак печени взрослых; первичный рак печени детского возраста; рак простаты; рак прямой кишки; почечно-клеточный рак (почки); почечно-клеточный рак детского возраста; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; ретинобластому; рабдомиосаркому детского возраста; рак слюнной железы; рак слюнной железы детского возраста; саркому, семейство опухолей Юинга; саркому Капоши; саркому (остеосаркому)/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости; саркому, рабдомиосаркому детского возраста; саркому мягких тканей взрослых; саркому, мягкие ткани детского возраста; синдром Сезари; рак кожи; рак кожи детского возраста; рак кожи (меланому); карциному кожи из клеток Меркеля; мелкоклеточный рак легкого; рак тонкой кишки; саркому мягких тканей взрослых; саркому мягких тканей, у детей; оккультный первичный плоскоклеточный рак шеи, метастатический; рак желудка (желудочный); рак желудка (желудочный) детского возраста; супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли детского возраста; Т-клеточную лимфому кожи; рак яичек; тимому детского возраста; злокачественную тимому; рак щитовидной железы; рак щитовидной железы детского возраста; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; трофобластическую опухоль, гестационную; неизвестной первичной локализации, рак детского возраста; необычные злокачественные новообразования детского возраста; переходно-клеточный рак мочеточника и почечной лоханки; рак уретры; саркому матки; рак влагалища; глиому зрительного пути и гипоталамуса детского возраста; рак вульвы; макроглобулинемию Вальденстрема; и опухоль Вильмса.

Другие иллюстративные злокачественные новообразования включают диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) и мантийно-клеточную лимфому (MCL).

Метастазы вышеупомянутых злокачественных новообразований также можно

лечить или предотвращать в соответствии со способами, описанными в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления эти способы могут приводить к уменьшению количества, степени тяжести или частоты одного или более симптомов злокачественного новообразования у субъекта (например, по сравнению с количеством, степенью тяжести или частотой одного или более симптомов злокачественного новообразования у субъекта до лечения).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, способы дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического агента (например, одного или более терапевтических агентов, перечисленных в таблице 2).

Таблица 2. Дополнительные терапевтические агенты

Торговое название антитела (название антитела)	Мишень
Raptiva™ (эфализумаб)	CD11a
Arzerra™ (офатумумаб)	CD20
Веххаг™ (тозитумомаб)	CD20
Gazyva™ (обинутузумаб)	CD20
Ocrevus™ (окрелизумаб)	CD20
Rituxan™ (ритуксимаб)	CD20
Zevalin™ (ибритумомаб тиуксетан)	CD20
Adcetris™ (брентуксимаб ведотин)	CD30
Myelotarg™ (гемтузумаб)	CD33
Mylotarg™ (гемтузумаб озогамицин)	CD33
(вадастуксимаб)	CD33
(вадастуксимаб талирин)	CD33
Campath™ (алемтузумаб)	CD52
Lemtrada™ (алемтузумаб)	CD52
Tactress™ (тамтуветмаб)	CD52
Soliris™ (экулизумаб)	C5 компонента
Ultomiris™ (равулизумаб)	C5 компонента
(олендализумаб)	C5 компонента
Yervoy™ (ипилимумаб)	CTLA-4

(тремелимумаб)	CTLA-4
Orencia™ (абатацепт)	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(летолизумаб)	CD40L
Rexomun™ (эртумаксамаб)	CD3/Her2
Erbix™ (цетуксимаб)	EGFR
Portrazza™ (нецитумумаб)	EGFR
Vectibix™ (панитумумаб)	EGFR
CH806	EGFR
(депатуксизумаб)	EGFR
(депатуксизумаб мафодотин)	EGFR
(футуксимаб: модотуксимаб)	EGFR
ICR62 (имгатузумаб)	EGFR
(лапритуксимаб)	EGFR
(лосатуксизумаб)	EGFR
(лосатуксизумаб ведотин)	EGFR
мкАт 528	EGFR
(матузумаб)	EGFR
(нимотузумаб)	EGFR
(томузотуксимаб)	EGFR
(залутумумаб)	EGFR
MDX-447	EGFR/CD64
(адекватумумаб)	ЕpCAM
Ranorex™ (эдреколомаб)	ЕpCAM
Vicinium™	ЕpCAM
Synagis™ (паливизумаб)	F-белок РСВ
ReoPro™ (абциксимаб)	Гликопротеиновые IIb/IIIa рецепторы
Herceptin™ (трастузумаб)	Her2
Herceptin™ Нулета (трастузумаб; гиалуронидаза)	Her2
(трастузумаб дерукстекан)	Her2
(гертузумаб вердотин)	Her2

Кадсула™ (трастузумаб эмтанзин)	Her2
(маргетуксимаб)	Her2
(тимигутузумаб)	Her2
Xolair™ (омализумаб)	IgE
(лигелизумаб)	IgE
(фигитумумаб)	IGF1R
(тепротумумаб)	IGF1R
Simulect™ (базиликсимаб)	IL2R
Zenarax™ (даклизумаб)	IL2R
Zinbryta™ (даклизумаб)	IL2R
Actemra™ (тоцилизумаб)	Рецептор IL-6
Kevzara™ (сарилумаб)	Рецептор IL-6
(вобарилизумаб)	Рецептор IL-6
Stelara™ (устекинумаб)	IL-12/IL-23
Tysabri™ (натализумаб)	Интегрин α4
(абрилумаб)	Интегрин α4
	Jagged 1 или Jagged 2
(фазинумаб)	NGF
(фулранумаб)	NGF
(танезумаб)	NGF
	Notch, например, Notch 1
Пидилизумаб	Дельта-подобный белок-1 (ингибитор пути PD-1)
Opdivo® (новолумаб)	PD1
Keytruda® (пембролизумаб)	PD1
Libtayo® (цемиплимаб)	PD1
BGB-A317 (тислелизумаб)	PD1
PDR001 (спартализумаб)	PD1
JNJ-63723283 (цетрелимаб)	PD1
TSR042 (достарлимаб)	PD1
AGEN2034 (балстилимаб)	PD1
JS001 (торипалимаб)	PD1
IOBI308 (синтилимаб)	PD1

BCD100 (пролголимаб)	PD1
CBT-501 (генолимзумаб)	PD1
ABBV181 (будигалимаб)	PD1
AK105	PD1
BI-754091	PD1
INCSHR-1210	PD1
MEDI0680	PD1
MGA012	PD1
SHR-1210	PD1
Imfinzi™ (дурвалумаб)	PD-L1
Tecentriq® (атезолизумаб)	PD-L1
Bavencio® (авелумаб)	PD-L1
KN035 (энвафолимаб)	PD-L1
BMS936559 (MDX1105)	PD-L1
BGBA 333	PD-L1
FAZ053	PD-L1
LY-3300054	PD-L1
SH-1316	PD-L1
AMP-224	PD-L2
(бавитуксимаб)	Фосфатидилсерин
huJ591	PSMA
RAV12	RAAG12
Prolia™ (деносумаб)	RANKL
GC1008 (фрезолимумаб)	TGF-бета
Cimzia™ (Цертолизумаб пегол)	TNF α
Remicade™ (инфликсимаб)	TNF α
Humira™ (адалимумаб)	TNF α
Simponi™ (голимумаб)	TNF α
Enbrel™ (этанерцепт)	TNF-R
(мапатумумаб)	TRAIL-R1
Avastin™ (бевацизумаб)	VEGF
Lucentis™ (ранибизумаб)	VEGF
(бролуцизумаб)	VEGF

Композиции/Наборы

В данном документе также предложены композиции (например, фармацевтические композиции), включающие любую из АСС, описанных в данном документе, и один или более (например, 1, 2, 3, 4 или 5) фармацевтически приемлемых носителей (например, любой из фармацевтически приемлемых носителей, описанных в данном документе), разбавители или эксципиенты.

В некоторых вариантах осуществления композиции (например, фармацевтические композиции), которые включают любую из АСС, описанных в данном документе, могут быть помещены в стерильный флакон или предварительно заполненный шприц.

В некоторых вариантах осуществления композиции (например, фармацевтические композиции), которые включают любой из АСС, описанных в данном документе, могут быть составлены для различных путей введения (например, внутривенного, подкожного, внутримышечного, внутрибрюшинного или внутриопухолевого).

В некоторых вариантах осуществления любая из фармацевтических композиций, описанных в данном документе, может включать один или более буферов (например, нейтральный солевой буфер, фосфатно-солевой буфер (PBS), аминокислоты (например, глицин), один или более углеводов (например, глюкозу, маннозу, сахарозу, декстран или маннит), один или более антиоксидантов, один или более хелатирующих агентов (например, ЭДТА или глутатион), один или более консервантов и/или фармацевтически приемлемый носитель (например, бактериостатическую воду, PBS, или солевой раствор).

В контексте данного документа фраза «фармацевтически приемлемый носитель» относится к любым и всем растворителям, дисперсионным средам, покрывающим веществам, антибактериальным агентам, противомикробным агентам, изотоническим агентам и агентам, замедляющим абсорбцию, и т. п., совместимым с фармацевтическим введением. Подходящие носители включают, но не ограничиваются ими: воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и около 5% сывороточного альбумина человека.

В некоторых вариантах осуществления любой из фармацевтических композиций, описанных в данном документе, любую из АСС, описанных в данном документе, получают с носителями, которые защищают от быстрого выведения из организма, например, составы с замедленным и контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые,

биосовместимые полимеры, например, этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких фармацевтических композиций и составов очевидны специалистам в данной области техники.

Также в данном документе предложены наборы, которые включают любую из АСС, описанных в данном документе, любую из композиций, которые включают любую из АСС, описанных в данном документе, или любую из фармацевтических композиций, которые включают любую из АСС, описанных в данном документе. Также предложены наборы, которые включают один или более вторых терапевтических агентов, выбранных из таблицы 2, в дополнение к АСС, описанной в данном документе. Вторым терапевтическим агент(-ы) может быть предложен в дозированной форме, которая отделена от АСС. В качестве альтернативы вторым терапевтическим агент(-ы) может быть составлен вместе с АСС.

Любой из наборов, описанных в данном документе, может включать инструкции по применению любой из композиций (например, фармацевтических композиций) и/или любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать инструкции для выполнения любого из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления наборы могут включать по меньшей мере одну дозу любой из композиций (например, фармацевтических композиций), описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать шприц для введения любой из описанных в данном документе фармацевтических композиций.

Настоящее изобретение включает и находит поддержку в любом одном или любой комбинации следующих пунктов:

1. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС – англ.: activatable cytokine construct), которая включает первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, где:
 - (a) первая мономерная конструкция содержит первую пептидную маску (PM1 – англ.: PM, peptide mask), первый зрелый белок-цитокин (CP1 – англ.: CP, mature cytokine protein), первый и третий расщепляемые фрагменты (CM1 и CM3 – англ.: CM, cleavable moiety) и первый домен димеризации (DD1 – англ.: DD, dimerization domain), где CM1 расположен между CP1, DD1 и CM3 расположены между PM1 и CP1; и
 - (b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый белок-цитокин (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2), где CM2 расположен между CP2 и DD2;

где DD1 и DD2 связываются друг с другом, образуя, таким образом, димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции.

2. АСС по пункту 1, отличающаяся тем, что вторая мономерная конструкция дополнительно содержит вторую пептидную маску (PM2) и четвертый расщепляемый фрагмент (CM4), где CM4 расположен между PM2 и CP2.
3. АСС по пункту 1 или пункту 2, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит первый полипептид, который содержит PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1, при этом необязательно, при этом первая мономерная конструкция имеет структурное расположение в направлении от N- к С-концу PM1-CM3-CP1-CM1-DD1, где каждая черточка (-) между компонентами АСС представляет либо прямую связь, либо связь через один или более линкеров.
4. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–3, отличающаяся тем, что вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, который содержит CP2, CM2 и DD2.
5. АСС по пункту 2, отличающаяся тем, что вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, который включает PM2, CM4, CP2, CM2 и DD2, при этом вторая мономерная конструкция необязательно имеет структурное расположение в направлении от N- к С-концу PM2-CM4-CP2-CM2-DD2.
6. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–5, отличающаяся тем, что CP1 и/или CP2 по отдельности выбран(-ы) из группы, состоящей из: интерферона, интерлейкина, GM-CSF, G-CSF, LIF, OSM, CD154, LT-β, TNF-α, TNF-β, 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE, TGF-β1, TGF-β1, TGF-β3, Еро, Тро, Flt-3L, SCF, M-CSF, и MSP, необязательно, где CP1 и/или CP2 независимо выбраны из IL-2, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, GM-CSF, TGF-бета, LIGHT, GITR-L, CD40L, CD27L, 4-1BB-L, OX40 и OX40L.
7. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–6, отличающаяся тем, что:
PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323 и 331–369, и CP1 представляет собой интерферон;
PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323, и 331–364, и CP1 представляет собой интерферон альфа;
PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 362–364, а CP1 представляет собой интерферон бета;
PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–

- 360, 366–369, а СР1 представляет собой интерферон гамма;
PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370–374, и СР1 представляет собой IL-12;
- PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 375–382, 469–477, 478, и СР1 представляет собой IL-15;
- PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 383–468, 469–478, и СР1 представляет собой IL-2; или
- PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 478 и 479, а СР1 представляет собой IL-21.
8. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 2–7, отличающаяся тем, что:
PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323, и 331–369, и СР2 представляет собой интерферон;
PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323 и 331–364, а СР2 представляет собой интерферон альфа;
PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 362–364, а СР2 представляет собой интерферон бета;
PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 366–369, а СР2 представляет собой интерферон гамма;
PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370–374, а СР2 представляет собой IL-12;
PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 375–382, 469–477, 478, и СР2 представляет собой IL-15;
PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 383–468, 469–478, и СР2 представляет собой IL-2; или
PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 478 и 479, а СР2 представляет собой IL-21.
9. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 2–8, отличающаяся тем, что PM1, PM2 или PM1 и PM2 содержат SEQ ID NO: 323.
10. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 2–9, отличающаяся тем, что PM1, PM2 или PM1 и PM2 содержат SEQ ID NO: 331.
11. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 2–10, отличающаяся тем, что PM1, PM2 или PM1 и PM2 содержат SEQ ID NO: 332.
12. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 2–11, содержащая связывающую область маски между PM1 и СР1, содержащую 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22

аминокислоты.

13. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 2–12, содержащая связывающую область маски между РМ2 и СР2, содержащую 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 аминокислоты.
14. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–13, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 представляют собой пару, выбранную из группы, состоящей из: пары доменов Fc; домена sushi из альфа-цепи рецептора IL-15 человека (IL15R α) и растворимого IL-15; барназы и барнстара; РКА и АКАР; модулей адаптера / стыковочной метки на основе мутированных фрагментов РНКазы I; эпитопа и sdAb; эпитопа и scFv; модулей SNARE, основанных на взаимодействии белков синтаксина, синаптоагмина, синаптобревина и SNAP25; антигенсвязывающего домена и эпитопа.
15. АСС по пункту 14, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc.
16. АСС по пункту 15, отличающаяся тем, что пара доменов Fc представляет собой пару доменов Fc человека.
17. АСС по пункту 16, отличающаяся тем, что домены Fc человека представляют собой домены Fc IgG1 человека, домены Fc IgG2 человека, домены Fc IgG3 человека или домены Fc IgG4 человека.
18. АСС по пункту 17, отличающаяся тем, что домены Fc человека представляют собой домены Fc IgG4 человека.
19. АСС по пункту 16, отличающаяся тем, что домены Fc человека содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 3.
20. АСС по пункту 19, отличающаяся тем, что домены Fc человека содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 3.
21. АСС по пункту 20, отличающаяся тем, что домены Fc человека содержат SEQ ID NO: 3.
22. АСС по пункту 14, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 содержат SEQ ID NO: 318 и 319, соответственно.
23. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–21, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 являются одинаковыми.
24. АСС по пункту 14, отличающаяся тем, что DD1 содержит антигенсвязывающий домен, а DD2 содержит соответствующий эпитоп.
25. АСС по пункту 24, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет

- собой антигенсвязывающий домен к His-метке, и при этом DD2 содержит His-метку.
26. АСС по пункту 24, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).
 27. АСС по пункту 24, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb).
 28. АСС по пункту 14, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из DD1 и DD2 содержит заместитель домена димеризации, выбранный из группы, состоящей из неполипептидного полимера и малой молекулы.
 29. АСС по пункту 28, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 содержат неполипептидные полимеры, ковалентно связанные друг с другом.
 30. АСС по пункту 29, отличающаяся тем, что неполипептидный полимер представляет собой серосодержащий полиэтиленгликоль, и при этом DD1 и DD2 ковалентно связаны друг с другом посредством одной или более дисульфидных связей.
 31. АСС по пункту 28, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из DD1 и DD2 содержит малую молекулу.
 32. АСС по пункту 31, отличающаяся тем, что малая молекула представляет собой биотин.
 33. АСС по пункту 32, отличающаяся тем, что DD1 содержит биотин, а DD2 содержит авидин.
 34. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–33, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 представляют собой зрелые цитокины.
 35. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–33, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 содержат сигнальный пептид.
 36. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–35, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 являются одинаковыми.
 37. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–35, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 являются разными.
 38. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–35, отличающаяся тем, что CP1 и/или CP2 представляет собой/являются интерфероном.
 39. АСС по пункту 38, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 представляют собой интерферон.
 40. АСС по пункту 38, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 представляют собой разные интерфероны.
 41. АСС по пункту 38, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 представляют собой один и тот же интерферон.
 42. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 38–41, отличающаяся тем, что

интерферон(-ы) представляет собой зрелый интерферон человека дикого типа.

43. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 38–42, отличающаяся тем, что интерферон(-ы) выбран(-ы) из группы, состоящей из интерферона альфа, интерферона бета, интерферона омега и интерферона тау.
44. АСС по пункту 43, отличающаяся тем, что интерфероны представляют собой интерферон альфа.
45. АСС по пункту 44, отличающаяся тем, что интерферон(-ы) выбран(-ы) из группы, состоящей из интерферона альфа-2а, интерферона альфа-2б и интерферона альфа-н3.
46. АСС по пункту 45, отличающаяся тем, что интерферон(-ы) представляет собой интерферон альфа-2б.
47. АСС по пункту 46, отличающаяся тем, что СР1 и/или СР2 содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 1.
48. АСС по пункту 47, отличающаяся тем, что СР1 и/или СР2 содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1.
49. АСС по пункту 48, отличающаяся тем, что СР1 и/или СР2 содержат последовательность SEQ ID NO: 1.
50. АСС по пункту 43, отличающаяся тем, что интерферон представляет собой интерферон бета.
51. АСС по пункту 50, отличающаяся тем, что интерферон бета выбран из группы, состоящей из интерферона бета-1а и интерферона бета-1б.
52. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–51, отличающаяся тем, что СР1 и/или СР2 содержат домен IFab.
53. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–38, отличающаяся тем, что СР1 и/или СР2 содержат интерлейкин.
54. АСС по пункту 53, отличающаяся тем, что интерлейкин выбран из группы, состоящей из IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-18, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-10, IL-20, IL-21, IL-14, IL-16, и IL-17.
55. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–54, отличающаяся тем, что каждый из СМ1 и СМ2 содержит в общей сложности от около 3 аминокислот до около 15 аминокислот.
56. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–55, отличающаяся тем, что один или более из СМ1, СМ2, СМ3 и СМ4 содержат субстраты для разных протеаз.
57. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–56, отличающаяся тем, что СМ1, СМ2 и СМ3 содержат субстраты для одной и той же протеазы.

58. ACC по любому одному или комбинации из пунктов 1–57, отличающаяся тем, что протеаза(-ы) выбрана(-ы) из группы, состоящей из: ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, BACE, ренина, катепсина D, катепсина E, каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 14, катепсина B, катепсина C, катепсина K, катепсина L, катепсина S, катепсина V/L2, катепсина X/Z/P, крузипаина, легумаина, отубаина-2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, KLK14, меприна, неприлизина, PSMA, BMP-1, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-24, MMP-26, MMP-27, активированного белка C, катепсина A, катепсина G, химазы, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, эластазы, гранзима B, гуанидинобензоатазы, HtrA1, нейтрофильной лиазы человека, лактоферрина, марапсина, NS3/4A, PACE4, плазмина, PSA, tPA, тромбина, триптазы, uPA, DESC1, DPP-4, FAP, гепсина, матриптазы-2, MT-SP1/матриптазы, TMPRSS2, TMPRSS3, и TMPRSS4.
59. ACC по пункту 58, отличающаяся тем, что протеаза(-ы) выбрана(-ы) из группы, состоящей из: uPA, легумаина, MT-SP1, ADAM17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, и MMP-14.
60. ACC по любому одному или комбинации из пунктов 1–57, отличающаяся тем, что CM1, CM2, CM3 и/или CM4 содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из: LSGRSDNH (SEQ ID NO: 5), TGRGPSWV (SEQ ID NO: 6), PLTGRSGG (SEQ ID NO: 7), TARGPSFK (SEQ ID NO: 8), NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 9), NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 10), TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 11), TSGRSANP (SEQ ID NO: 12), VHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 13), AVGLLAPP (SEQ ID NO: 14), AQNLLGMV (SEQ ID NO: 15), QNQALRMA (SEQ ID NO: 16), LAAPLGLL (SEQ ID NO: 17), STFPFGMF (SEQ ID NO: 18), ISSGLLSS (SEQ ID NO: 19), PAGLWLDP (SEQ ID NO: 20), VAGRSMRP (SEQ ID NO: 21), VVPEGRRS (SEQ ID NO: 22), ILPRSPAF (SEQ ID NO: 23), MVLGRSLL (SEQ ID NO: 24), QGRAITFI (SEQ ID NO: 25), SPRSIMLA (SEQ ID NO: 26), SMLRSMPL (SEQ ID NO: 27), ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 29), ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 30), LSGRSGNH (SEQ ID NO: 31), SGRSANPRG (SEQ ID NO: 32), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), LSGRSDIH (SEQ ID NO: 34), LSGRSDQH (SEQ ID NO: 35), LSGRSDTH (SEQ ID NO: 36), LSGRSDYH (SEQ ID NO: 37), LSGRSDNP (SEQ ID NO: 38), LSGRSANP (SEQ ID NO: 39), LSGRSANI (SEQ ID NO: 40), LSGRSDNI (SEQ ID NO:

41), MIAPVAYR (SEQ ID NO: 42), RPSPMWAY (SEQ ID NO: 43), WATPRPMR (SEQ ID NO: 44), FRLLDWQW (SEQ ID NO: 45), ISSGL (SEQ ID NO: 46), ISSGLLS (SEQ ID NO: 47), ISSGLL (SEQ ID NO: 48), ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 49), AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 50), AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 51), ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 52), ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 53), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 55), ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 56), ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 57), ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 58), ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 59), AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 60), AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 61), AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 62), AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 63), AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 64), AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 65), AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 66), AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 67), ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68), AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 69), GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 70), GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 71), LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 72), ISSGLSS (SEQ ID NO: 73), PVGYTSSL (SEQ ID NO: 74), DWLYWPGI (SEQ ID NO: 75), LKAAPRWA (SEQ ID NO: 76), GPSHLVLT (SEQ ID NO: 77), LPGGLSPW (SEQ ID NO: 78), MGLFSEAG (SEQ ID NO: 79), SPLPLRVP (SEQ ID NO: 80), RMHLRSLG (SEQ ID NO: 81), LLAPSHRA (SEQ ID NO: 82), GPRSFGL (SEQ ID NO: 83), GPRSG (SEQ ID NO: 84), SARGPSRW (SEQ ID NO: 85), GGWHTGRN (SEQ ID NO: 86), HTGRSGAL (SEQ ID NO: 87), AARGPAIH (SEQ ID NO: 88), RGPANPM (SEQ ID NO: 89), SSRGPAYL (SEQ ID NO: 90), RGPATPIM (SEQ ID NO: 91), RGPA (SEQ ID NO: 92), GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 93), FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 94), SPLTGRSG (SEQ ID NO: 95), SAGFSLPA (SEQ ID NO: 96), LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 97), SGGPLGVR (SEQ ID NO: 98), PLGL (SEQ ID NO: 99) и SGRSDNI (SEQ ID NO: 100).

61. ACC по пункту 60, отличающаяся тем, что CM1, CM2, CM3 и/или CM4 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), SGRSDNI (SEQ ID NO: 100), и ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68).
62. ACC по любому одному или комбинации из пунктов 1–61, отличающаяся тем, что протеаза(-ы) продуцируется(-ются) опухолью у субъекта.
63. ACC по пункту 62, отличающаяся тем, что у субъекта было диагностировано или идентифицировано злокачественное новообразование.
64. ACC по любому одному или комбинации из пунктов 1–63, отличающаяся тем, что CP1

- и СМ1 непосредственно примыкают друг к другу в первой мономерной конструкции.
65. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–64, отличающаяся тем, что СМ1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу в первой мономерной конструкции.
66. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–65, отличающаяся тем, что СР2 и СМ2 непосредственно примыкают друг к другу во второй мономерной конструкции.
67. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–66, отличающаяся тем, что СМ2 и DD2 непосредственно примыкают друг к другу во второй мономерной конструкции.
68. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–63, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер.
69. АСС по пункту 68, отличающаяся тем, что по меньшей мере один линкер представляет собой линкер L1, расположенный между РМ1 и СМ3, и/или линкер L2, расположенный между СМ3 и СР1.
70. АСС по пункту 68, отличающаяся тем, что вторая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер.
71. АСС по пункту 70, отличающаяся тем, что по меньшей мере один линкер представляет собой линкер L3, расположенный между РМ2 и СМ4, и/или линкер L4, расположенный между СМ4 и СР2.
72. АСС по пункту 71, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит линкер L1, а вторая мономерная конструкция содержит линкер L3.
73. АСС по пункту 72, отличающаяся тем, что L1 и L3 являются одинаковыми.
74. АСС по пункту 71, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит линкер L2, а вторая мономерная конструкция содержит линкер L4.
75. АСС по пункту 74, отличающаяся тем, что L2 и L4 являются одинаковыми.
76. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 68–75, отличающаяся тем, что каждый линкер имеет общую длину от 1 аминокислоты до около 15 аминокислот.
77. АСС по пункту 76, отличающаяся тем, что каждый линкер имеет общую длину по меньшей мере 5 аминокислот.
78. АСС по пункту 68, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер, при этом каждый линкер независимо выбран из группы, состоящей из GSSGSGGSGG (SEQ ID NO: 210); GGGS (SEQ ID NO: 2); GGGSGGGS (SEQ ID NO: 211); GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 212); GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213); GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214); GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 215); GGGGS (SEQ ID NO: 216); GS; GGGSGS (SEQ ID NO: 217); GGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 218); GGSLDPKGGGGS (SEQ ID NO:

219); PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 220); SKYGPPCPPCPAPEFLG (SEQ ID NO: 221); GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 222); GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 223); GSTSGSGKSSEGSSTKG (SEQ ID NO: 224); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 225); GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226); (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 227), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 228), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 216), где каждый n представляет собой целое число, равное по меньшей мере единице; GGSG (SEQ ID NO: 229); GSGG (SEQ ID NO: 230); GSGG (SEQ ID NO: 231); GSGGG (SEQ ID NO: 232); GGGG (SEQ ID NO: 233); GSSG (SEQ ID NO: 234); GGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 213); GGGSGGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 214); GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226); SGGG (SEQ ID NO: 327) и SGGG (SEQ ID NO: 492).

79. ACC по пункту 78, отличающаяся тем, что линкер содержит последовательность GGGG (SEQ ID NO: 2).
80. ACC по любому одному или комбинации из пунктов 1–79, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит в направлении от N-конца к C-концу PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1.
81. ACC по любому одному или комбинации из пунктов 1–79, отличающаяся тем, что первый полипептид содержит в направлении от C-конца к N-концу PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1.
82. ACC по любому одному или комбинации из пунктов 1–81, отличающаяся тем, что второй полипептид содержит в направлении от N-конца к C-концу CP2, CM2 и DD2.
83. ACC по любому одному или комбинации из пунктов 1–82, отличающаяся тем, что второй полипептид содержит в направлении от C-конца к N-концу CP2, CM2 и DD2.
84. ACC по любому одному или комбинации из пунктов 1–36, 38, 39 или 41–83, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция являются одинаковыми.
85. ACC по любому одному или комбинации из пунктов 1–79, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит в направлении от N-конца к C-концу PM1, необязательный линкер, CM3, необязательный линкер, CP1, CM1 и DD1, при этом CP1 и CM1 непосредственно примыкают друг к другу, при этом CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу, при этом CM1 представляет собой пептид, состоящий не более чем из 10 аминокислот, при этом вторая мономерная конструкция является такой же, как и первая мономерная конструкция, и при этом первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом через по меньшей мере две дисульфидные связи.

86. АСС по пункту 85, отличающаяся тем, что каждый из DD1 и DD2 представляет собой домен Fc человека, имеющий N-конец в положении цистеина 216, пронумерованный в соответствии с нумерацией EU.
87. АСС по пункту 85 или пункту 86, отличающаяся тем, что CM1 представляет собой пептид, состоящий не более чем из 7 аминокислот.
88. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 85–87, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 содержат аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1.
89. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–88, отличающаяся тем, что АСС характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2.
90. АСС по пункту 89, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна из активности CP1 и CP2 представляет собой уровень пролиферации клеток лимфомы.
91. АСС по пункту 89, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна из активности CP1 и CP2 представляет собой уровень активации пути JAK/STAT/ISGF3 в клетке лимфомы.
92. АСС по пункту 89, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна активность представляет собой уровень продукции SEAP в клетке лимфомы.
93. АСС по пункту 89, отличающаяся тем, что АСС характеризуется по меньшей мере 2-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и CP2 по сравнению с контрольным уровнем.
94. АСС по пункту 93, отличающаяся тем, что АСС характеризуется по меньшей мере 5-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем.
95. АСС по пункту 94, отличающаяся тем, что АСС характеризуется по меньшей мере 10-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем.
96. АСС по пункту 95, отличающаяся тем, что АСС характеризуется по меньшей мере 500-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем.
97. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 89–95, отличающаяся тем, что контрольный уровень по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 представляет собой активность CP1 и/или CP2 в АСС после воздействия на АСС протеазы (протеаз).
98. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 89–97, отличающаяся тем, что

контрольный уровень по меньшей мере одного CP1 и/или CP2 представляет собой соответствующую активность CP1 и/или CP2 соответствующего зрелого цитокина дикого типа.

99. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 89–98, отличающаяся тем, что АСС характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия протеазы (протеаз), при этом продукт расщепления имеет по меньшей мере одну активность CP1 и/или CP2.
100. АСС по пункту 99, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна активность CP1 и/или CP2 представляет собой антипролиферативную активность.
101. АСС по пункту 100, отличающаяся тем, что контрольный уровень представляет собой значение EC50, и при этом отношение EC50 (продукт расщепления) к EC50 (контрольный уровень) составляет менее около 10, или менее около 9, или менее около 8, или менее около 7, или менее около 6, или менее около 5, или менее около 4, или менее около 3, или менее около 2, или менее около 1,5, или менее около 1,0.
102. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–101, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция характеризуется тем, что CP1 и DD1 связаны связывающей областью не более чем из 18 аминокислот, так что связывающая область не более чем из 18 аминокислот включают CM3.
103. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–102, отличающаяся тем, что вторая мономерная конструкция характеризуется тем, что CP2 и DD2 связаны связывающей областью не более чем из 18 аминокислот, так что связывающая область не более чем из 18 аминокислот включают CM2.
104. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–103, отличающаяся тем, что PM1 содержит менее 50 аминокислот.
105. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 2–104, отличающаяся тем, что PM2 содержит менее 50 аминокислот.
106. АСС по пункту 105, отличающаяся тем, что каждый из PM1 и PM2 содержит менее 19 аминокислот.
107. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–103, отличающаяся тем, что PM1 не является пептидом, ассоциированным с латентностью, и PM2 не является пептидом, ассоциированным с латентностью.
108. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–103, отличающаяся тем, что PM1 не является рецептором цитокина, а PM2 не является рецептором цитокина и/или не имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%

идентичности с рецептором цитокина.

109. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–103, отличающаяся тем, что РМ1 не является фрагментом рецептора цитокина и/или не имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с рецептором цитокина.
110. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–103 и 109, отличающаяся тем, что РМ2 не является фрагментом рецептора цитокина.
111. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–103, отличающаяся тем, что РМ1 не является альбумином, а РМ2 не является альбумином.
112. Композиция, содержащая АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–111.
113. Композиция по пункту 112, отличающаяся тем, что композиция представляет собой фармацевтическую композицию.
114. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащий по меньшей мере одну дозу композиции по пункту 112 или пункту 113.
115. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества АСС по любому из пунктов 1–96 или композиции по пунктам 112 или 113.
116. Способ по пункту 115, отличающийся тем, что у субъекта идентифицировано или диагностировано злокачественное новообразование.
117. Способ по пункту 116, отличающийся тем, что злокачественное новообразование представляет собой лимфому.
118. Способ по пункту 117, отличающийся тем, что лимфома представляет собой лимфому Беркитта.
119. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит СР1 и СМ1 из АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–111.
120. Нуклеиновая кислота по пункту 109, отличающаяся тем, что полипептид дополнительно содержит DD1 по любому одному или комбинации из пунктов 1–21 или пунктов 28–111.
121. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит СР2 и СМ2 из АСС по любому одному или комбинации из пунктов 1–111.
122. Нуклеиновая кислота по пункту 111, отличающаяся тем, что полипептид дополнительно содержит DD2 по любому одному или комбинации из пунктов 1–21 или пунктов 28–111.

123. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому одному или комбинации из пунктов 119–122.
124. Вектор по пункту 123, отличающийся тем, что вектор представляет собой вектор экспрессии.
125. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому одному или комбинации из пунктов 119–122, или вектор по пунктам 123 или 124.
126. Пара нуклеиновых кислот, которые вместе кодируют полипептид, содержащий CP1 и CM1 из первой мономерной конструкции, и полипептид, содержащий CP2 и CM2 из второй мономерной конструкции по любому одному или комбинации из пунктов 1–111.
127. Пара векторов, которые вместе образуют пару нуклеиновых кислот по п. 126.
128. Пара векторов по пункту 127, отличающаяся тем, что пара векторов представляет собой пару векторов экспрессии.
129. Клетка, содержащая пару нуклеиновых кислот по пункту 126 или пару векторов по пунктам 127 или 128.
130. Способ получения АСС, включающий:
- а. культивирование клетки по пункту 125 или пункту 129 в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для получения АСС; и
 - б. выделение АСС из клетки или жидкой культуральной среды.
131. Способ по пункту 130, дополнительно включающий: выделение АСС, выделенной из клетки или жидкой культуральной среды.
132. Способ по пункту 131, дополнительно включающий: введение выделенной АСС в фармацевтическую композицию.
133. АСС, полученная с помощью способа по пункту 130.
134. Композиция, содержащая АСС по пункту 133.
135. Композиция по пункту 134, отличающаяся тем, что композиция представляет собой фармацевтическую композицию.
136. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащий по меньшей мере одну дозу композиции по пункту 134 или пункту 135.
137. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 89–101, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна активность CP1 и/или CP2 представляет собой аффинность связывания CP1 и/или CP2 с его когнатным рецептором, определяемую с помощью поверхностного плазмонного резонанса.
138. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС), содержащая первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, отличающаяся тем, что:

- (a) первая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий первую пептидную маску (PM1), первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый и третий расщепляемые фрагменты (CM1 и CM3) и первый домен димеризации (DD1);
 - (b) вторая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий вторую пептидную маску (PM2), второй зрелый белок-цитокин (CP2), второй и четвертый расщепляемые фрагменты (CM2 и CM4) и второй домен димеризации (DD2);
 - (c) первая мономерная конструкция содержит в направлении от N-конца к C-концу PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1, дополнительно при этом:
 - (i) PM1 содержит не более 20 аминокислот и связывается с CP1,
 - (ii) CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу,
 - (iii) CP1 и CM1 непосредственно примыкают друг к другу,
 - (iv) CM1 содержит не более 12 аминокислот,
 - (v) каждый из CM1 и CM3 функционирует в качестве субстрата для протеазы, и
 - (vi) CP1 представляет собой зрелый интерферон;
 - (d) дополнительно при этом:
 - (i) вторая мономерная конструкция является такой же, как и первая мономерная конструкция,
 - (ii) DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc IgG человека;
 - (iii) DD1 и DD2 связываются друг с другом через по меньшей мере одну дисульфидную связь, тем самым образуя гомодимер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и
 - (e) АСС характеризуется сниженным уровнем активности интерферона по сравнению с соответствующим интерфероном дикого типа или соответствующим пэгилированным интерфероном.
139. АСС по пункту 138, отличающаяся тем, что CP1 представляет собой зрелый интерферон альфа, а PM1 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 323.
140. АСС по пункту 138 или 139, отличающаяся тем, что каждый из CM1 и CM3 независимо функционирует в качестве субстрата урокиназы (uPa) и/или матриксной металлопротеиназы (MMP).
141. АСС по пункту 140, отличающаяся тем, что каждый из CM1 и CM3 независимо функционирует в качестве субстрата урокиназы (uPa) и/или MMP-14.
142. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–141, отличающаяся тем, что зрелый интерферон представляет собой зрелый интерферон альфа человека.

143. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–142, отличающаяся тем, что зрелый интерферон альфа представляет собой зрелый интерферон альфа-2b.
144. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–143, отличающаяся тем, что зрелый интерферон альфа представляет собой укороченную форму зрелого интерферона альфа-2b дикого типа.
145. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–144, отличающаяся тем, что зрелый интерферон содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 1.
146. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–145, отличающаяся тем, что зрелый интерферон содержит последовательность SEQ ID NO: 1.
147. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–146, отличающаяся тем, что каждый из CM1 и CM3 содержит не более 8 аминокислот.
148. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–147, отличающаяся тем, что CM1 и CM3 являются одинаковыми.
149. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–148, отличающаяся тем, что каждый из CM1 и CM3 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 41.
150. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–148, отличающаяся тем, что каждый из CM1 и CM3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 100.
151. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–150, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc IgG4 человека.
152. АСС по пункту 151, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc IgG4 человека, усеченных на N-конце до цистеина 226, пронумерованных согласно нумерации EU.
153. АСС по пункту 151 или пункту 152, отличающаяся тем, что домены Fc IgG4 человека содержат мутацию S228P, пронумерованную согласно нумерации EU.
154. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–153, отличающаяся тем, что каждая из DD1 и DD2 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 3.
155. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–154, отличающаяся тем, что каждая из DD1 и DD2 содержит последовательность SEQ ID NO: 3.
156. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–155, отличающаяся тем, что первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом через

по меньшей мере две дисульфидные связи.

157. АСС по пункту 156, отличающаяся тем, что первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом через по меньшей мере три дисульфидные связи.
158. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–157, отличающаяся тем, что:
первая мономерная конструкция дополнительно содержит первую сигнальную последовательность на N-конце, а вторая мономерная конструкция дополнительно содержит вторую сигнальную последовательность на N-конце.
159. АСС по пункту 158, отличающаяся тем, что каждая из первой и второй сигнальных последовательностей содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 244.
160. АСС по пункту 159, отличающаяся тем, что каждая из первой и второй сигнальных последовательностей содержит последовательность SEQ ID NO: 244.
161. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 158–160, отличающаяся тем, что:
первая мономерная конструкция дополнительно содержит первый спейсер, расположенный между первой сигнальной последовательностью и PM1, а вторая мономерная конструкция дополнительно содержит второй спейсер, расположенный между второй сигнальной последовательностью и PM2.
162. АСС по пункту 161, отличающаяся тем, что каждый из первого и второго спейсеров содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 256.
163. АСС по пункту 162, отличающаяся тем, что каждый из первого и второго спейсеров содержит последовательность SEQ ID NO: 256.
164. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–163, дополнительно содержащая линкер L1 между PM1 и CM3 и/или линкер L2 между CM3 и CP1, где каждый из L1 и L2 независимо содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 27 (где $n=1$), последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 324, или отсутствует.
165. АСС по пункту 164, отличающаяся тем, что L1 содержит последовательность SEQ ID NO: 27 (где $n = 1$), а L2 содержит последовательность SEQ ID NO: 324.
166. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–165, содержащая связывающую область, содержащую не более 12 аминокислот.

167. АСС по пункту 166, отличающаяся тем, что связывающая область содержит от 7 до 12 аминокислот.
168. АСС по пункту 166, отличающаяся тем, что связывающая область содержит 7 аминокислот.
169. АСС по любому из пунктов 138–168 или их комбинации, отличающаяся тем, что АСС характеризуется по меньшей мере 2000-кратным снижением активности интерферона альфа по сравнению с интерфероном альфа дикого типа.
170. АСС по пункту 169, отличающаяся тем, что АСС характеризуется по меньшей мере 4000-кратным снижением активности интерферона альфа по сравнению с интерфероном альфа дикого типа.
171. АСС по пункту 170, отличающаяся тем, что АСС характеризуется по меньшей мере 5000-кратным снижением активности интерферона альфа по сравнению с интерфероном альфа дикого типа.
172. АСС по любому из пунктов 138–168 или их комбинации, отличающаяся тем, что АСС характеризуется по меньшей мере 2000-кратным снижением активности интерферона альфа по сравнению с пэгилированным интерфероном альфа.
173. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–172, отличающаяся тем, что снижение активности интерферона определяют путем сравнения EC50 АСС с EC50 интерферона дикого типа или пэгилированного интерферона в анализе антипролиферативной активности с использованием клеток лимфомы.
174. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–173, отличающаяся тем, что снижение активности интерферона определяют путем сравнения EC50 АСС с EC50 интерферона дикого типа или пэгилированного интерферона в анализе индукции продукции секретлируемой эмбриональной щелочной фосфатазы с использованием клеток НЕК293, чувствительных к интерферону.
175. АСС по любому из пунктов 138–174, отличающаяся тем, что АСС дополнительно характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия протеазы (протеаз), для которых СМ1 и СМ3 функционируют в качестве субстрата, при этом отношение активности соответствующего интерферона дикого типа к продукту расщепления составляет менее около 2.
176. АСС по пункту 175, отличающаяся тем, что EC50 продукта расщепления примерно такая же, как EC50 соответствующего интерферона дикого типа.
177. АСС по пункту 138, отличающаяся тем, что каждая из первой и второй мономерных конструкций содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95%

идентичности с SEQ ID NO: 321, или при этом каждая из первой и второй мономерных конструкций содержит последовательность SEQ ID NO: 321 или идентична SEQ ID NO: 321, при этом АСС характеризуется по меньшей мере 1000-кратным снижением активности интерферона по сравнению с интерфероном альфа-2b дикого типа, и при этом АСС дополнительно характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия uPA, при этом продукт расщепления обладает примерно такой же активностью интерферона, что и интерферон альфа-2b дикого типа, при этом активность интерферона измеряют в анализе антипролиферативной активности с использованием клеток лимфомы или в анализе индукции продукции секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы с использованием клеток НЕК293, чувствительных к интерферону.

178. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС), содержащая первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, отличающаяся тем, что:

- (a) первая мономерная конструкция содержит первую пептидную маску (PM1), первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый и третий расщепляемые фрагменты (CM1 и CM3) и первый домен димеризации (DD1);
- (b) вторая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий вторую пептидную маску (PM2), второй зрелый белок-цитокин (CP2), второй и четвертый расщепляемые фрагменты (CM2 и CM4) и второй домен димеризации (DD2);
- (c) первая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1, дополнительно при этом:
 - (i) PM1 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 323,
 - (ii) CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу,
 - (iii) CM1 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 41, и
 - (iv) CP1 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 1;
- (d) дополнительно при этом:
 - (i) вторая мономерная конструкция является такой же, как и первая мономерная конструкция,
 - (ii) DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc IgG4 человека;
- (e) DD1 и DD2 ковалентно связываются друг с другом через по меньшей мере одну

- дисульфидную связь, образуя таким образом гомодимер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и
- (f) АСС характеризуется пониженным уровнем активности интерферона альфа по сравнению с активностью интерферона альфа для пэгилированного интерферона альфа-2b.
179. АСС по пункту 178, отличающаяся тем, что РМ2 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичности с одной из SEQ ID NO: 323, 331 или 332.
180. АСС по пункту 138, отличающаяся тем, что каждая из первой и второй мономерных конструкций содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 321, или при этом каждая из первой и второй мономерных конструкций содержит последовательность SEQ ID NO: 321 или идентична SEQ ID NO: 321, при этом АСС проявляет более низкую токсичность *in vivo* по сравнению либо с интерфероном альфа-2b дикого типа, либо с пэгилированным интерфероном альфа-2b.
181. Композиция, содержащая АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–180.
182. Композиция по п. 181, отличающаяся тем, что композиция представляет собой фармацевтическую композицию.
183. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащий по меньшей мере одну дозу композиции по пункту 181 или пункту 182.
184. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–179 или композиции по пункту 181 или пункту 182.
185. Способ по пункту 184, отличающийся тем, что у субъекта идентифицировано или диагностировано злокачественное новообразование.
186. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит первый мономер АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–179.
187. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по пункту 186.
188. Вектор по пункту 187, отличающийся тем, что вектор представляет собой вектор экспрессии.
189. Клетка млекопитающего, содержащая нуклеиновую кислоту по пункту 186 или вектор по пункту 187 или пункту 188.
190. Клетка млекопитающего по пункту 189, отличающаяся тем, что клетка млекопитающего представляет собой клетку НЕК293 или клетку CHO.

191. Способ производства АСС, включающий:
экспрессию АСС в клетке млекопитающего по пункту 189 или пункту 190; и
очистку экспрессированной АСС.
192. АСС по любому одному или комбинации из пунктов 138–180, отличающаяся тем, что каждый из СМ1 и СМ3 функционирует в качестве субстрата для протеазы, которая сверхэкспрессируется в опухолевой ткани.
193. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что РМ1, РМ2 или РМ1 и РМ2 содержат SEQ ID NO: 323.
194. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что РМ1, РМ2 или РМ1 и РМ2 содержат SEQ ID NO: 331.
195. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что РМ1, РМ2 или РМ1 и РМ2 содержат SEQ ID NO: 332.
196. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что СР1 и DD1 связаны связывающей областью не более чем из 15 аминокислот, так что связывающая область не более чем из 15 аминокислот включает СМ3.
197. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что вторая мономерная конструкция характеризуется тем, что СР2 и DD2 связаны связывающей областью не более чем из 15 аминокислот, так что связывающая область не более чем из 15 аминокислот включают СМ2.
198. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что РМ1, РМ2 или РМ1 и РМ2 не являются пептидом, ассоциированным с латентностью.
199. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что РМ1, РМ2 или РМ1 и РМ2 не являются цитокином.
200. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что РМ1, РМ2 или РМ1 и РМ2 не являются рецептором цитокина и/или не имеют аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с рецептором цитокина.
201. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что РМ1, РМ2 или РМ1 и РМ2 не являются фрагментом рецептора цитокина.
202. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что РМ1, РМ2 или РМ1 и РМ2 не являются альбумином.

203. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что РМ1, РМ2 или РМ1 и РМ2 содержат менее 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 или 10 аминокислот.
204. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что АСС имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик:
- (i) структурная схема в направлении от N-конца к С-концу, включающая: РМ1-СМ3-СР1-СМ1-DD1 и СР2-СМ2-DD2, где DD1 и DD2 димеризованы;
 - (ii) структурная схема в направлении от N-конца к С-концу, включающая: РМ1-СМ3-СР1-СМ1-DD1 и РМ2-СМ4-СР2-СМ2-DD2, где DD1 и DD2 димеризованы;
 - (iii) где каждый из РМ1 и РМ2 содержит менее 40 аминокислот;
 - (iv) где каждый из РМ1 и РМ2 не является рецептором для СР1 и СР2;
 - (v) при этом каждый из РМ1 и РМ2 не имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с рецептором цитокина;
 - (vi) где каждый из РМ1 и РМ2 не является фрагментом рецептора для СР1 и СР2;
 - (vii) где каждый из РМ1 и РМ2 содержит от 13 до 49 аминокислот;
 - (viii) при этом первая мономерная конструкция характеризуется тем, что СР1 и DD1 связаны связывающей областью не более чем из 18 аминокислот, так что связывающая область не более чем из 18 аминокислот включают СМ3;
 - (ix) когда АСС имеет ориентацию N-РМ-СМ1-СР-СМ2-DD-С, то весь участок аминокислот от N-конца АСС до N-концевой аминокислоты цитокина имеет длину от 17 до 71 аминокислоты, а когда АСС имеет ориентацию N-DD-СМ1-СР-СМ2-РМ-С, то весь диапазон аминокислот от С-конца АСС до С-концевой аминокислоты цитокина имеет длину от 17 до 71 аминокислоты; и/или
 - (x) при этом вторая мономерная конструкция характеризуется тем, что СР2 и DD2 связаны связывающей областью не более чем из 18 аминокислот, так что связывающая область не более чем из 18 аминокислот включают СМ2.
205. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция имеет только одну пептидную маску.
206. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что вторая мономерная конструкция имеет только одну пептидную

маску.

207. АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция имеет только одну пептидную маску, а вторая мономерная конструкция имеет только одну пептидную маску.

208. Способ снижения высвобождения IP-10 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение АСС по любому одному или комбинации из любых предшествующих элементов.

ПРИМЕРЫ

Изобретение далее описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

Пример 1. Характеристика *in vitro* иллюстративных цитокиновых конструкций

Активируемую цитокиновую конструкцию ProC440 получали рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции ProC440 были идентичными, каждая из которых представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 316 и сигнальную последовательность на своем N-конце. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к C-концу сигнальную последовательность (например, SEQ ID NO: 244), зрелый белок-цитокин, который соответствует человеческому интерферону альфа-2b (SEQ ID NO: 1), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и домен димеризации, соответствующий Fc IgG4 человека, укороченный по Cys226 (в соответствии с нумерацией EU) и включающий мутацию S228P (SEQ ID NO: 3).

Полипептид получали путем трансформации клетки-хозяина полинуклеотидом, имеющим последовательность SEQ ID NO: 316, с последующим культивированием полученных рекомбинантных клеток-хозяев. Димеризация полученных экспрессированных полипептидов позволяла получить цитокиновую конструкцию ProC440.

Активность ProC440 тестировали *in vitro* с использованием чувствительных к IFN клеток HEK293 и клеток Daudi. См. Фиг. 7A и 7B, соответственно.

Чувствительные к IFN клетки HEK293 получали путем стабильной трансфекции человеческими генами STAT2 и IRF9 для получения полностью активного сигнального пути IFN I типа. Клетки также имеют индуцируемый репортерный ген SEAP (секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза) под контролем промотора ISG54, индуцируемого IFN α/β . Для поддержания экспрессии трансгена клетки культивировали в

среде DMEM GlutaMax с добавлением 10% FBS, Pen/Strep, 30 мкг/мл бластицидина, 100 мкг/мл зеоцина и 100 мкг/мл нормоцина. Добавление IFN типа I к этим клеткам активирует путь JAK/STAT/ISGF3 и впоследствии индуцирует выработку SEAP, которую можно легко оценить в супернатанте с помощью раствора Quanti-Blue, колориметрического определения активности щелочной фосфатазы.

Клетка Daudi относится к линии клеток, полученной из В-лимфобластных клеток человека. Клетки Daudi получали в концентрации 2×10^5 клеток/мл в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS, и аликвоты по 50 мкл пипеткой вносили в лунки белого плоскодонного 96-луночного планшета (10 тыс./лунку). Тестируемую ProC440 или контроли разводили в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS. Готовили повторные пятикратные серийные разведения, из которых в каждую лунку добавляли по 50 мкл. После 3 дней инкубации при 37 °C использовали набор для определения жизнеспособности для измерения уровней внутриклеточного АТФ в качестве косвенной оценки количества оставшихся жизнеспособных клеток. 100 мкл CellTiter-Glo добавляли непосредственно в планшеты, которые затем помещали на орбитальный шейкер на 10 минут. После этой инкубации непосредственно измеряли люминесцентный сигнал с помощью планшетного ридера Envision. Были построены кривые доза-ответ, и значения EC50 были получены с помощью сигмоидальной аппроксимирующей нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism.

В обоих анализах с использованием клеток HEK293 и клеток Daudi активность ProC440 была снижена как минимум в 1000 раз по сравнению с IFN α -2b от StemCell Technologies (человеческий рекомбинантный IFN-alpha2b, доступный от StemCell Technologies, кат. № 78077.1) (Фиг. 7А и 7В). Это указывает на то, что слияние расщепляемого домена димеризации, соответствующего Fc IgG человека, обеспечивает стерическое маскирование IFN α -2b в конструкции ProC440. Активация протеазы uPa восстанавливала активность до уровня, сравнимого с рекомбинантным цитокином. Значения EC50 для ProC440, ProC440 + uPA и IFN α -2b от StemCell Technologies были рассчитаны на основе результатов анализа IFN α / β и представлены ниже в Таблице 3.

Таблица 3. EC50: Репортерный анализ IFN α / β

	ProC440	ProC440 + uPA	IFN α -2b от StemCell Technologies
EC50	7643	4,333	10,88

Значения EC50 для ProC440, ProC440 + uPA и IFN α -2b от StemCell Technologies были

рассчитаны на основе результатов анализа апоптоза клеток Daudi и представлены ниже в Таблице 4.

Таблица 4. EC50: Анализ апоптоза клеток Daudi

	ProC440	ProC440 + uPA	IFN α -2b от StemCell Technologies
EC50	264,2	0,1842	0,3530

Расщепление с помощью uPa в ожидаемом сайте расщепляемого фрагмента было подтверждено электрофорезом и масс-спектрометрическим анализом (Фиг. 6А и 6В). Результаты свидетельствуют о том, что протеаза uPa была эффективна при расщеплении расщепляемых фрагментов в активируемой цитокиновой конструкции ProC440. В дополнение к чувствительности к активации uPa ProC440 расщеплялся MMP14 (Фиг. 6А-6С). На Фиг. 6А представлены результаты гель-электрофореза; в левом столбце показан ProC440, который не подвергался воздействию протеазы, в среднем столбце показан ProC440, подвергнутый воздействию протеазы uPA, а в крайнем правом столбце показан ProC440, подвергнутый воздействию MMP14. Анализ с помощью масс-спектрометрии идентифицировал сайт расщепления MMP14 на С-конце IFN α -2b, рядом с расщепляемым фрагментом (Фиг. 6В). Активация протеазы с помощью MMP14 также восстанавливала активность до уровня, сравнимого с рекомбинантным цитокином (Фиг. 6С). Данные демонстрируют, что ProC440 восстановила полную активность после расщепления внутренних и сконструированных расщепляемых фрагментов протеазами, такими как uPa или MMP14.

Активируемую цитокиновую конструкцию ProC732 получали рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции этого АСС были идентичными, причем каждая из них представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, показанную на Фиг. 8 (SEQ ID NO: 321 с иллюстративной необязательной сигнальной последовательностью). Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к С-концу сигнальную последовательность, спейсерную (QSGQ) последовательность, маскирующий IFN α -2b пептид (SEQ ID NO: 323), линкер (SEQ ID NO: 324), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 (LSGRSDNI), линкер (SEQ ID NO: 227, где n=1), зрелый белок-цитокин, соответствующий человеческому интерферону альфа-2b (SEQ ID NO:1), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и

DD, соответствующий Fc S228P IgG4 человека, укороченный до Cys226 (в соответствии с нумерацией EU) (SEQ ID NO:3).

Еще одну активируемую цитокиновую конструкцию ProC733 получали рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции этого АСС были идентичными, каждая из которых представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, показанную на Фиг. 9 (SEQ ID NO: 322 с иллюстративной дополнительной сигнальной последовательностью). Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к C-концу сигнальную последовательность, спейсерную последовательность (например, QSGQ), маскирующий IFN α -2b пептид (SEQ ID NO: 323), линкер (SEQ ID NO: 324), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, линкер (SEQ ID NO: 227, где n=1), зрелый белок-цитокин, соответствующий человеческому интерферону альфа-2b (SEQ ID NO:1), и DD, соответствующий Fc S228P IgG4 человека, включая полную шарнирную последовательность (SEQ ID NO: 4). Поскольку в конструкции ProC733 отсутствует расщепляемый фрагмент между последовательностью цитокина и DD, она лишь частично активируется, как обсуждается ниже.

Маскированные цитокиновые конструкции ProC732 и ProC733 получали путем трансформации клетки-хозяина полинуклеотидами, кодирующими последовательности SEQ ID NO: 321 и 322 соответственно, с последующим культивированием полученных рекомбинантных клеток-хозяев. Димеризация полученных экспрессированных полипептидов позволяла получить цитокиновые конструкции ProC732 и ProC733, соответственно.

Активность ProC732, ProC733 и ProC440 тестировали *in vitro* с использованием чувствительных к IFN клеток HEK293, как описано ранее. Активность ProC732 и ProC733 была дополнительно снижена по сравнению с ProC440 (Фиг. 10А-10С). Это указывает на то, что добавление пептидной маски обеспечивало дополнительную силу маскирования, даже несмотря на то, что цитокиновая активность уже была значительно снижена в ProC440 за счет стерического маскирования с помощью доменов димеризации. Неожиданно оказалось, что добавление маскирующего пептида (PM) не мешает стерическому маскированию с помощью DD, а также DD не мешает маскированию с помощью PM. Активация протеазы uPa восстанавливала активность ProC732 до уровня, сравнимого с уровнем ProC440 после активации протеазы uPa. Это указывает на то, что ProC732 после активации протеазой восстановила полную активность немаскированного IFN α -2b.

ProC733 содержит аффинную пептидную маску, присоединенную к IFN α -2b

посредством расщепляемого фрагмента, при этом С-конец IFN α -2b непосредственно слит с Fc IgG человека (без расщепляемого фрагмента, расположенного между цитокином и областью Fc). Активация протеазой uPa восстанавливала активность ProC733 до уровня, сравнимого с уровнем неактивированного ProC440. Это дополнительно указывает на то, что в дополнение к стерической маскировке, обеспечиваемой расщепляемым Fc IgG человека, или ограничению димеризацией IFN α -2b, маска расщепляемого аффинного пептида обеспечивает дополнительную маскирующую силу для IFN α -2b. Значения EC50 для ProC440, ProC440 + uPa, ProC732, ProC732 + uPa, ProC733 и ProC733 + uPa были рассчитаны на основе результатов анализа IFN α / β и представлены ниже в таблице 5.

Таблица 5. EC50: Репортерный анализ IFN α / β

	ProC440	ProC440 + uPA	ProC732	ProC732 + uPA	ProC733	ProC733 + uPA
EC50	0,6344	0,0004	40,69	0,0005	21,83	0,2977

Эффективность маскирования АСС в репортерном анализе НЕК (измеренная путем сравнения EC50 нерасщепленного АСС с EC50 расщепленного АСС) была следующей:

ProC440: 1358X

ProC732: 7380X

ProC733: 60X

Таким образом, высокие уровни эффективности маскирования (например, >5000x) могут быть достигнуты в АСС, которые включают как пептидную маску, так и стерическую маскировку посредством доменов димеризации, как показано, например, на Фиг. 10С.

Как показано на Фиг. 42А-42D, каждая из пептидных масок (Фиг. 42А (без пептидной маски) и Фиг. 42В (маскированная пептидом)) и Fc-маски (Фиг. 42С (без Fc-маски) и 42D (Fc-маскированная)) влияет на связывание АСС с рецептором. Учитывая полученные данные, можно утверждать, что синергетическая активность была получена благодаря применению двойной маскирующей структуры АСС по настоящему изобретению. Активность рекомбинантного IFN α 2b, мономерного IFN α 2b/Fc, активированного гомодимерного IFN α 2b/Fc и гомодимерного IFN α 2b/Fc тестировали *in vitro* с использованием чувствительных к IFN клеток НЕК293, как описано ранее. Рекомбинантный IFN α 2b, мономерный IFN α 2b/Fc, активированный гомодимерный IFN α 2b/Fc и гомодимерный IFN α 2b/Fc получали, как описано выше. Активность гомодимерного IFN α 2b/Fc была существенно снижена по сравнению с рекомбинантным IFN α 2b, но восстанавливалась за счет активации протеазы до уровня, соответствующего рекомбинантному IFN α 2b (Фиг. 31). На Фиг. 31 также показано, что мономерный IFN α 2b/Fc

проявлял активность примерно на среднем уровне между активностью, наблюдаемой для активированного и неактивированного гомодимерного IFN α 2b/Fc.

Кроме того, ProC440 демонстрирует существенно сниженную активность по сравнению с ProC440, обработанным uPA (Фиг. 35A). Та же молекула, но с субстратом NSUB, восстанавливала активность в ответ на MMP, что указывает на наличие скрытого сайта расщепления (Фиг. 35A). Активность как ProC732, так и ProC1299 (делеция L161) восстанавливалась с помощью uPA (Фиг. 35B). Делеция L161 (в сайте расщепления MMP14) предотвращает активацию ProC1301 (субстрат NSUB) даже в присутствии MMP14 или uPA (Фиг. 35C).

Пример 2: Переносимость цитокиновых конструкций *in vivo*

Человеческий IFN α -2b перекрестно реагирует с рецептором IFN α хомяка, и ранее было показано, что он активен у хомяка (Altrock et al, Journal of Interferon Research, 1986). Для оценки переносимости цитокиновых конструкций, содержащих IFN α -2b, сирийским золотым хомякам вводили начальную дозу 0,4 мг/кг. Животные получали одну дозу тестируемого соединения и оставались в исследовании до 7 дней после введения дозы, если не была выявлена непереносимая токсичность. Начальная доза (0,4 мг/кг) представляет собой эквивалентную дозу IFN α -con (рекомбинантный интерферон альфа, не встречающийся в природе интерферон типа I, производимый Amgen под названием Infergen®), который, как ожидается, вызовет потерю массы тела, снижение потребления пищи и подавление функции костного мозга у хомяка (125 г). Если начальная доза переносилась, животных переводили на «среднюю дозу» 2 мг/кг и вводили три дозы тестируемого соединения, если не возникало непереносимости. При хорошей переносимости животные переводились на «высокую дозу» 10 мг/кг и получали три дозы тестируемого соединения, если не возникало непереносимости. При хорошей переносимости животных переводили на «более высокую дозу» 15 мг/кг. На каждом этапе, если тестируемая доза не переносилась, животное переводили на следующую, более низкую дозу. Если начальная доза не переносилась, животное переводили на «более низкую дозу» 0,08 мг/кг. Животным также вводили немаскированные слитые конструкции IFN α -2b Fc ProC286. В качестве отрицательного контроля животным вводили IgG4 человека.

ProC286 (ChIgG4 5AA 1204DNIdL IFN α 2b) также получали рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции были идентичными, каждая из которых представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 326 и сигнальную последовательность на его N-конце. Каждая из 1-й и 2-й

мономерных конструкций содержит от N-конца к C-концу сигнальную последовательность, DD, соответствующую Fc S228P IgG4 человека, включая ESKYGPP (SEQ ID NO: 317), шарнирную последовательность (SEQ ID NO:4), линкер (SEQ ID NO:327), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:100, линкер (SEQ ID NO: 228) и зрелый белок-цитокин, который соответствует человеческому интерферону альфа-2b (SEQ ID NO:1).

ProC291 (NhIgG4 5AA 1204DNIIdL IFNa2b) также получали рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции были идентичными, каждая из которых представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 496 и сигнальную последовательность на его N-конце. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к C-концу сигнальную последовательность, зрелый белок-цитокин, который соответствует человеческому интерферону альфа-2b (SEQ ID NO: 1), линкер (SEQ ID NO: 492), CM (SEQ ID NO: 100), линкер (GGGS) и область Fc IgG4 человека, включающую ESKYGPP (SEQ ID NO: 317), шарнирную последовательность (SEQ ID NO: 4).

Активность ProC286 и ProC291 сравнивали с активностью Sylatron® (PEG-IFN-alpha2b) в анализе апоптоза клеток Daudi (Фиг. 11A-11B). В этом анализе ProC286 и Sylatron® демонстрируют аналогичные уровни активности, как показано на Фиг. 11A. Это указывает на то, что активность ProC286 аналогична коммерчески доступному пэгилированному IFN-alpha2b, и его можно использовать в качестве суррогатного контроля Sylatron для оценки переносимости IFN α -2b в исследовании на хомяках. ProC291 показал пониженную активность по сравнению с ProC286 и Sylatron®, что указывает на то, что структурная ориентация N-конца IFN по отношению к Fc важна для снижения активности. То есть, когда DD представляет собой пару доменов Fc, расположение цитокина на N-конце по отношению к DD (как в ProC291) может обеспечить большее снижение активности цитокина, чем когда цитокин расположен на C-конце по отношению к DD (как в ProC286).

В 1 день животным вводили дозы, указанные на Фиг. 12A. В течение одной недели продолжали исследование на животных, если не было достигнуто непереносимой дозы (DLT). Клинические наблюдения, массу тела и температуру измеряли до введения дозы и через 6 часов, 24 часа, 72 часа, 7 дней после введения дозы для каждого животного. Образцы крови для гематологического и биохимического анализа собирали через 72 часа, 7 дней после введения дозы для каждого животного. Гематологический и биохимический анализы выполняли сразу после взятия пробы. Для гематологического анализа оценивали мазок крови, лейкоцитарную формулу, гематокрит, гемоглобин, средний корпускулярный

гемоглобин, средний корпускулярный объем, количество тромбоцитов, количество эритроцитов (красных кровяных телец), относительную ширину распределения эритроцитов по объему, количество ретикулоцитов и количество лейкоцитов (белых кровяных телец). Панель клинического биохимического анализа включала измерение аланинаминотрансферазы, альбумина, соотношения альбумин/глобулин, щелочной фосфатазы, аспартатаминотрансферазы, кальция, хлоридов, холестерина, креатинкиназы, креатина, гамма-глутамитрансферазы, глобулина, глюкозы, неорганического фосфора, калия, натрия, общего билирубина, общего белка, триглицеридов, мочевины, азота и С-реактивного белка. Данные о токсичности в исследовании переносимости приведены на Фиг. 13А-13С, 14 и 15.

В целом, животные, которым вводили конструкции ProC286, показали в среднем 5% потерю массы тела при дозе 2 мг/кг (т. е. 2 мг/кг) и 15% потерю массы тела при дозе 10 мг/кг и 15 мг/кг (Фиг. 13А-13С). У одного животного, которому вводили ProC286 в дозе 15 мкг/кг, через 7 дней после введения дозы (конец исследования) наблюдали потерю массы тела на 20%. Она считается непереносимой дозой. Напротив, у животных, которым вводили ProC440 и ProC732 в дозах 2 мг/кг и 10 мг/кг, не наблюдали потери массы тела (Фиг. 13А-13В). У животных, которым вводили ProC440 в дозе 15 мкг/кг, наблюдали в среднем 5% потерю массы тела (Фиг. 13А-13С). У животных, получавших ProC732 в дозе 15 мг/кг, не наблюдали потерю массы тела (Фиг. 13С). Это свидетельствует о том, что маскировка IFN α -2b по отношению к его рецептору в контексте ProC440 ограничивает опосредованную IFN α -2b потерю массы тела. У животных, которым вводили немаскированный IFN α 2b/Fc при дозе 15 мг/кг, наблюдали повышенный уровень ALP (и повышенный уровень ALP обнаруживали при 0,4 мг/кг) по сравнению с животными, которым вводили дозы маскированного и с двойной маской IFN α 2b/Fc. Результаты демонстрируют, что маскированный IFN α 2b/Fc хорошо переносится в дозе до 15 мг/кг в модели токсичности у хомяков.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что расположение интерферона на N-конце DD и использование относительно короткого LR ингибирует цитокиновую активность в контексте ProC440, снижая токсичность интерферона по сравнению с пэгилированным IFN α -2b (Sylatron®) или ProC286. Неожиданно добавление пептидной аффинной маски на N-конце цитокина в контексте ProC732 полностью устраняет опосредованную IFN α -2b потерю массы тела при дозе по меньшей мере 15 мг/кг. Таким образом, использование как расщепляемой пептидной маски, так и расщепляемого домена димеризации снижает токсичность и позволяет вводить более высокие дозы, что

потенциально приводит к улучшению терапевтического окна для этого терапевтического средства на основе цитокина.

С точки зрения клинической биохимии, у животных, которым вводили ProC286, наблюдалось значительное повышение уровня щелочной фосфатазы (ALP) при всех дозах (0,4 мкг, 2 мкг, 10 мкг и 15 мкг) через 7 дней после введения дозы (конец исследования) (Фиг. 14). Не было зафиксировано значительного увеличения уровня ALP, когда животным вводили 10 или 15 мг/кг ProC440 или ProC732 (Фиг. 14). Повышение уровня ALT является маркером гепатотоксичности. Было показано, что IFN α -2b индуцирует гепатотоксичность. Это указывает на то, что маскировка связывания IFN α -2b по отношению к его рецептору в контексте ProC440 и ProC732 ограничивает опосредованную IFN α -2b гепатотоксичность.

Что касается гематологических показателей, то через 3 дня после введения дозы и через 7 дней после введения дозы (окончание исследования) у животных, получавших ProC286 в дозах 2, 10 и 15 мг/кг, наблюдалось значительное снижение количества ретикулоцитов, нейтрофилов и лейкоцитов (белых кровяных телец) (Фиг. 15). Это снижение напоминает опосредованную IFN α -2b миелотоксичность. Через три дня после введения дозы у животных, получавших ProC440 и ProC732, наблюдали снижение количества ретикулоцитов, нейтрофилов и лейкоцитов (белых кровяных телец) (Фиг. 15). В целом уровень снижения количества гемопоэтических клеток, наблюдаемый у животных, получавших дозы ProC440 и ProC732, не столь значителен, как уровни снижения, наблюдаемые у животных, получавших дозу ProC286. Через 7 дней после введения дозы (окончание исследования) у животных, получавших дозы ProC732 и ProC440, общий уровень количества ретикулоцитов, нейтрофилов и лейкоцитов (белых кровяных телец) вернулся к нормальному уровню или был аналогичен тому, который наблюдали у животных, получавших отрицательный контроль IgG4 (Фиг. 15). У животных, получавших ProC286, уровень количества ретикулоцитов, нейтрофилов и лейкоцитов (белых кровяных телец) остается низким. Это указывает на то, что маскировка IFN α -2b по отношению к его рецептору в контексте ProC440 и ProC732 ограничивает опосредованную IFN α -2b миелотоксичность.

Пример 3. Антипролиферативный эффект *in vitro* цитокиновых конструкций с линкерами различной длины на раковые клетки

Антипролиферативные эффекты слитых конструкций IFN α -2b-hIgG4 Fc с различной длиной линкера или без линкера между IFN α -2b и hIgG4 Fc тестировали *in vitro* с использованием клеток Daudi. Тест проводили с использованием анализа клеток Daudi, описанного в Примере 1.

Слитые белки, протестированные в этом эксперименте, включают в направлении от N-конца к С-концу последовательность зрелого цитокина IFN-альфа-2b, необязательный линкер и/или расщепляемый фрагмент и домен Fc человеческого IgG4 SEQ ID NO: 4 (включая полную шарнирную область, так что N-конец последовательности Fc начинается с аминокислотной последовательности ESKYGPPPPPC...) (SEQ ID NO: 500) (первые одиннадцать аминокислот SEQ ID NO: 4). Последовательность ESKYGPP (SEQ ID NO: 317; первые семь аминокислот SEQ ID NO: 4) добавляет 7 аминокислот в «связывающую область» этих конструкций. Первая конструкция (связывающая область = 7) не содержит линкер или расщепляемый фрагмент; ее последовательность в направлении от N-конца к С-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 4. Вторая конструкция (связывающая область = 12) содержит линкер из 5 аминокислот SGGGG (SEQ ID NO: 492) и не содержит CM; ее последовательность в направлении от N-конца к С-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 492, слитой с SEQ ID NO: 4. Третья конструкция (связывающая область = 18) содержит CM из 7 аминокислот (SGRSDNI) (SEQ ID NO: 100) и линкер из 4 аминокислот GGGS (SEQ ID NO: 228); ее последовательность в направлении от N-конца к С-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 100, слитой с SEQ ID NO: 2, слитой с SEQ ID NO: 4. Четвертая конструкция (связывающая область = 23) содержит линкер из 5 аминокислот, CM из 7 аминокислот и линкер из 4 аминокислот; ее последовательность в направлении от N-конца к С-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 492, слитой с SEQ ID NO: 100, слитой с SEQ ID NO: 2, слитой с SEQ ID NO: 4. Пятая конструкция (связывающая область = 24) содержит CM из 13 аминокислот (ISSGLLSGRSDNI) (SEQ ID NO: 68) и линкер из 4 аминокислот; ее последовательность в направлении от N-конца к С-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 68, слитой с SEQ ID NO: 2, слитой с SEQ ID NO: 4.

На Фиг. 16 показана активность вышеуказанных ACC в клетках Daudi. ACC, протестированные в этом примере, не имели прикрепленной к ним пептидной аффинной маски. Данные демонстрируют, что длина гибких линкеров и длина связывающей области (LR) между цитокином и доменом Fc оказывали влияние на активность (нерасщепленных) ACC. Конструкции с нулевыми линкерами или короткими линкерами и, соответственно, коротким LR демонстрируют пониженную цитокиновую активность, тогда как конструкции с более длинными линкерами и, следовательно, более длинным LR имеют более высокий уровень цитокиновой активности.

Пример 4. Характеристика дополнительных активируемых цитокиновых конструкций *in vitro*

Дополнительные активируемые цитокиновые конструкции без пептидной маски также получали рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции этих АСС были идентичными. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к С-концу сигнальную последовательность, зрелый белок-цитокин, который соответствует человеческому интерферону альфа-2b (SEQ ID NO: 1), расщепляемый фрагмент (CM), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100 (SGRSDNI), и домен димеризации, соответствующий Fc S228P IgG4 человека (содержащий SEQ ID NO: 3). Кроме того, эти АСС содержат или не содержат линкер, имеющий аминокислотную последовательность SGGGG (SEQ ID NO: 492) между CP и CM. Эти АСС содержат или не содержат линкер, имеющий аминокислотную последовательность GGGG (SEQ ID NO: 228) между CM и DD. Эти АСС также содержат или не содержат части шарнира DD, которые являются N-концевыми по отношению к цистеину 226 (согласно нумерации EU). Эти дополнительные активируемые цитокиновые конструкции описаны в таблице 6.

Таблица 6: Активируемые цитокины, имеющие различную длину связывающей области

Название	Альтернативное название	Линкер между CP и CM	Линкер между CM и DD	N-концевые остатки шарнира Fc	Длина связывающей области
ProC288	IFNa2b 1204DNI 0AA Fc	SGGGG (SEQ ID NO: 492)	отсутствует	отсутствует	12
ProC289	IFNa2b 1204DNI 3AA Fc	SGGGG (SEQ ID NO: 492)	отсутствует	GPP	15
ProC290	IFNa2b 1204DNI 7AA Fc	SGGGG (SEQ ID NO: 492)	отсутствует	ESKYGPP (SEQ ID NO: 317) (первые семь аминокисл	19

				от SEQ ID NO:4)	
ProC291	IFNa2b 1204DNI 11AA Fc	SGGGG (SEQ ID NO: 492)	GGGS (SEQ ID NO: 2)	ESKYGPP (SEQ ID NO: 317) (первые семь аминокисл от SEQ ID NO:4)	23
ProC440	N IFNa2b 0 1204DNIIdL 0AA Fc	отсутствует т	отсутствует т	отсутствует	7
ProC441	N IFNa2b 0 1204DNIIdL 3AA Fc	отсутствует т	отсутствует т	GPP	10
ProC442	N IFNa2b 0 1204DNIIdL 7AA Fc	отсутствует т	отсутствует т	ESKYGPP (SEQ ID NO: 317) (первые семь аминокисл от SEQ ID NO:4)	14
ProC443	N IFNa2b 0 1204DNIIdL 11AA Fc	отсутствует т	GGGS (SEQ ID NO: 2)	ESKYGPP (SEQ ID NO: 317) (первые семь аминокисл от SEQ ID NO:4)	18

Активность ProC440, ACC без гибких линкеров и области Fc IgG4, укороченной до Cys226 (т.е. содержащей связывающую область из 7 аминокислот), и активность дополнительных ACC, содержащих различные последовательности гибких линкеров и

области Fc (т. е. связывающие области, содержащие более 7 аминокислот), тестировали *in vitro* с использованием чувствительных к IFN клеток HEK293 и клеток Daudi, как описано ранее. В обоих анализах активность (например, антипролиферативные эффекты) ProC440 была снижена по сравнению со всеми другими АСС с более длинными связывающими областями, которые содержат различные дополнительные последовательности между цитокином и первой аминокислотой, связывающей DD с соответствующим вторым мономером (т. е. Cys226 IgG4 согласно нумерации EU). Значения EC50 для АСС были рассчитаны по результатам анализа IFN α/β и представлены ниже в таблице 7.

Таблица 7. EC50: Репортерный анализ IFN α/β

	Pro C288	Pro C289	Pro C290	Pro C291	Pro C440	Pro C441	Pro C442	Pro C443
EC50	34,34	17,93	10,33	8,743	41,37	6,28	6,637	1,687

Значения EC50 для АСС были рассчитаны по результатам анализа апоптоза клеток Daudi и представлены ниже в таблице 8.

Таблица 8. EC50: Анализ апоптоза клеток Daudi

	Pro C288	Pro C289	Pro C290	Pro C291	Pro C440	Pro C441	Pro C442	Pro C443
EC50	112,8	64,55	23,04	13,39	2078	1053	642,9	478

Данные в таблицах 7–8 также демонстрируют, что активность (нерасщепленных) АСС можно модулировать, изменяя длину связывающей области.

АСС, протестированные в этом примере 4, не содержат пептидную маску. На основании представленных в данном документе экспериментальных результатов, сравнивающих ProC440 с ProC732, активность нерасщепленных АСС может быть дополнительно снижена путем добавления расщепляемого фрагмента и пептидной маски к N-концу цитокиновой конструкции. Аналогичным образом, на основании приведенных в данном документе данных, сравнивающих ProC440 и ProC732, АСС, дополнительно содержащие SM и PM на N-конце, могут иметь повышенную эффективность маскирования по сравнению с АСС, которые не содержат PM.

Пример 5. Универсальные цитокиновые конструкции

Универсальную активируемую цитокиновую конструкцию получали описанными в данном документе рекомбинантными методами. Универсальную АСС имеет последовательность универсального интерферона (ProC859), обладающую активностью

как в клетках человека, так и в клетках мыши, как показано на Фиг. 17А. Универсальная АСС представляет собой димер. 1-я и 2-я мономерные конструкции этого АСС были идентичными, каждая из которых представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, с сигнальной последовательностью на его N-конце. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к С-концу сигнальную последовательность, зрелый белок-цитокин, который соответствует молекуле универсального интерферона, представляющей собой гибрид IFN альфа 1 и IFN альфа 2а (SEQ ID NO: 481), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и домен димеризации, соответствующий Fc IgG человека (SEQ ID NO: 3).

Активность универсальной цитокиновой конструкции тестировали *in vitro* с использованием чувствительных к IFN клеток НЕК293 и мышинных клеток меланомы В16. Активность ProC859 была снижена по меньшей мере в 150 раз по сравнению с мышинным IFN α 4. Активация протеазы с помощью uPA восстанавливала активность до уровня, сравнимого с мышинным IFN α 4, как показано на Фиг. 17В. Значения EC50 для АСС ProC859, АСС ProC859 + uPA и мышинного IFN α 4 были рассчитаны по результатам анализа и представлены на Фиг. 17В.

EC50: Репортерный анализ IFN α / β В16

	ProC859 (АСС)	ProC859 (АСС) + uPA	IFN α 4
EC50	293,7	1,951	1,966

АСС с универсальным IFN и пептидной маской в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены рекомбинантными методами, описанными в данном документе. Пептидные маски соединены с универсальным интерфероном для дополнительного снижения цитокиновой активности АСС по сравнению с ProC859. 1-я и 2-я мономерные конструкции этого АСС идентичны, каждая из которых представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к С-концу сигнальную последовательность (например, одну из SEQ ID NO: 242–244), маскирующий пептид (например, любой один РМ, выбранный из группы состоящий из SEQ ID NO: 323, 328–479), необязательный линкер (например, любой, выбранный из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 210–263), расщепляемый фрагмент (например, любой, выбранный из SEQ ID NO: 5–100 и 264–279), необязательный

линкер (например, любой, выбранный из SEQ ID NO: 2, 210–263, 324, 325, 327), зрелый белок-цитокин, который соответствует молекуле универсального интерферона, представляющей собой гибрид IFN альфа 1 и IFN альфа 2а (SEQ ID NO: 481), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и домен димеризации, соответствующий Fc IgG человека (SEQ ID NO: 3). Активность универсальной АСС тестируют *in vitro* с использованием чувствительных к IFN клеток НЕК293 и мышинных клеток меланомы В16. На основании представленных в данном документе экспериментальных результатов, сравнивающих ProC440 с ProC732, ожидается, что присутствие аффинной маски (PM) еще больше снизит цитокиновую активность нерасщепленной АСС по сравнению с ProC859, но позволит полностью восстановить цитокиновую активность, когда СМ расщепляются протеазой, тем самым дополнительно снижая токсичность и улучшая терапевтическое окно.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, на основании представленных в данном документе результатов авторы изобретения предусматривают применение аффинной маски (PM) на N-конце цитокина в дополнение к применению DD с относительно коротким LR на С-конце цитокина будет обеспечивать значительную маскировку цитокиновой активности для цитокинов в дополнение к цитокинам в виде интерферона-альфа, представленным в приведенных выше конкретных примерах. Как описано выше, изобретение, описанное в данном документе, охватывает активируемые конструкции цитокинов, которые включают различные белки-цитокины, обсуждаемые в данном документе. В качестве неограничивающих примеров СР, используемые в АСС по изобретению, могут быть любыми из перечисленных в SEQ ID NO: 101–209 и их вариантами. В частности, мономерные цитокины подходят для применения в АСС, описанных в данном документе. На основании результатов, представленных в данном документе, считается, что АСС по изобретению будут демонстрировать пониженную цитокиновую активность по сравнению с соответствующим цитокином дикого типа, и что при расщеплении АСС соответствующей протеазой (протеазами) продукт расщепления восстанавливает цитокиновую активность, сходную с активностью соответствующего цитокина дикого типа.

Пример 6: Переносимость цитокиновых конструкций у приматов, отличных от человека

В предыдущих исследованиях с использованием обычного IFN-a2b с пролонгированным периодом полужизни (пэгилированный IFN-a2b - эталонный PEG-IFN ВLA #99–148, RMS #1039494, исследование 95028) (PEG-IFN, PEG-INTRONTM) у яванских

макаков сообщалось, что однократное подкожное введение дозы 117,721 мкг/м² (приблизительно 9,8 мг/кг) было связано с преходящим отсутствием аппетита, гипотермией, гипотензией и смертью нескольких животных. В этих предыдущих исследованиях с использованием пэгилированного IFN- α 2b сообщалось, что доза, не вызывающая наблюдаемых нежелательных эффектов, (NOAEL) составляла ~4,9 мг/кг у мужчин (58,860 мкг/м²) и ~2,5 мг/кг у женщин (29,440 мкг/м²).

В этом примере для оценки переносимости маскированной пептидом конструкции IFN α -2b ACC (ProC732) у приматов, отличных от человека, яванским макакам подкожно вводили дозы 0,03, 0,30, 3,0 и 15 мг/кг массы тела. Обезьяны (N=2 на группу, разного пола) получали одну дозу маскированного ACC и оставались в исследовании до 14–28 дней после введения дозы. Концентрации в плазме измеряли с течением времени, как показано на Фиг. 39.

Всех животных осматривали в клетке не менее двух раз в день (утром/вечером) для выявления признаков ухудшения состояния здоровья, заболеваемости, смертности, травм, жизнеспособности, наличия/доступности корма и воды. Цельную кровь собирали в соответствующие пробирки с антикоагулянтом примерно через 48 часов после введения дозы (3-й день) и на 7-й, 15-й, 22-й и 29-й дни.

Гематологические параметры включали следующее: лейкоцитарную формулу; среднюю величину объема эритроцитов; лейкоцитарную формулу в абсолютных значениях; среднее содержание гемоглобина в эритроците; количество эритроцитов; среднюю концентрацию корпускулярного гемоглобина; гемоглобин; количество тромбоцитов; гематокрит; относительную ширину распределения эритроцитов по объему; количество ретикулоцитов.

Параметры клинической биохимического анализа включали: натрий; калий; хлориды; щелочную фосфатазу; аланинаминотрансферазу; аспартатаминотрансферазу; глюкозу; концентрацию азота мочевины в крови; креатинин; гамма-глутамилтрансферазу; общий холестерин; триглицериды; общий белок; альбумин; глобулин (расчетный); соотношение альбумин/глобулин (расчетное); кальций; неорганический фосфор; общий билирубин.

Оцениваемые цитокины включали следующие: IL-2; IP-10 (CXCL 10); IL-6; IL-12p70; IFN-гамма; IL-10. Концентрацию IP-10 в плазме измеряли с помощью анализа MSD V-PLEX (Meso Scale Diagnostics, Роквилл, штат Мэриленд), как показано на Фиг. 40А, и наносили на график зависимости от концентрации ProC732 в плазме, как показано на Фиг. 40В.

Кроме того, часть образцов цельной крови в течение суток доставлялась в аналитическую

лабораторию для анализа методом проточной цитометрии через 24–36 часов после их отбора. Оценки методом FACS включали следующее: жизнеспособность / CD20/ CD45/ CD14/ CD3/ CD159a/ CD4/ Ki67/ CD8/ PD-L1.

В целом, у животных, получавших ProC732 во всех дозах, не было клинических признаков побочных эффектов. Признаков отсутствия аппетита, гипотермии, гипотонии и снижения массы тела не наблюдали. Клинический биохимический и гематологический анализ, проведенный на 3-й, 7-й и 15-й день после введения дозы, не продемонстрировал отклонений от заданных нормальных диапазонов для всех показателей за одним исключением: одно животное, получавшее 15 мг/кг ProC732, продемонстрировало повышенный показатель AST через 3 дня после введения лекарственного средства. В конструкции ACC IFN α -2b, замаскированной пептидом яванского макака (ProC732, также называемой Pb-IFN-alpha2b), продемонстрирована линейная фармакокинетика и увеличенный период полужизни, и она хорошо переносилась в дозах до 15 мг/кг. Результаты обобщены в следующей таблице:

	0,03 мг/кг	0,3 мг/кг	3 мг/кг	15 мг/кг
Нежелательные явления	-	-	-	-
Повышение AST	-	-	-	+/-
Снижение уровня лейкоцитов	-	-	-	+/-
Увеличение Ki67 в НК, Т-клетках	-	-	+	+
Повышенный уровень IP-10	-	-	+	++

В целом эти результаты указывают на повышенную переносимость условно маскированного IFN-a2b по настоящему изобретению вплоть до самой высокой протестированной дозы 15 мг/кг как у особей мужского пола, так и у особей женского пола по сравнению с обычным IFN-a2b с пролонгированным периодом полужизни.

Пример 7. Характеристика высвобождения CXCL10 и IFN-гамма, индуцированного РВМС, *in vitro*

Индукцированное CXCL-10 и IFN-гамма высвобождение в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) здорового донора оценивали *in vitro* с использованием необработанных PBMC и PBMC, обработанных конструкцией ACC, замаскированной пептидом IFN α -2b, (ProC732), или ProC732, активированной обработкой протеазой *in vitro* в течение 5 часов в присутствии брэфельдина А в дозах 1 нг/мл (Фиг. 19, верхний ряд) или 10 нг/мл (Фиг. 19, нижний ряд). Клетки окрашивали на CD3/CD19/CD14, фиксировали/пермеабелизировали и окрашивали на внутриклеточную экспрессию CXCL10 и IFN-гамма. Гейтирование основывалось на жизнеспособных моноцитах (Фиг. 19, верхний ряд) или жизнеспособных CD19-отрицательных лимфоцитах (Фиг. 19, нижний ряд). Эти результаты демонстрируют, что ProC732 индуцирует высвобождение CXCL10 и IFN-гамма из PBMC в зависимости от активации.

Пример 8: Подавление опухоли *in vivo* маскированным IFN α -2b

Опухолесупрессивный эффект маскированной конструкции IFN α -2b ACC (ProC732) оценивали *in vivo* с использованием мышей Beige/SCID, которым подкожно имплантировали 10×10^6 клеток Daudi, выращенных в бессывороточной среде (1:1 матригель). Измерения опухоли регистрировали два раза в неделю в течение всего периода исследования, как указано на оси x графика, приведенного на Фиг. 20. Мыши (n=8 в группе) получали PBS (контроль) или ProC732 в дозах 0,02 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,5 мг/кг один раз в неделю в течение пяти недель. Лечение начинали, как только средний объем опухоли достиг приблизительно 200 мм³. Как показано на Фиг. 20, у мышей, получавших условно активный ProC732, наблюдалось дозозависимое уменьшение среднего объема опухоли. ProC732 индуцировала полную регрессию при таких низких дозах, как 0,1 мг/кг до 20-го дня исследования, а доза 0,5 мг/кг индуцировала полную регрессию на протяжении всего исследования.

На Фиг. 36 показано, что ProC732 и ProC1301 ингибируют рост объема опухоли дозозависимым образом. ProC440, ProC732 и ProC1301 показали полное подавление опухоли при дозе 0,1 мг/кг.

Пример 9: Активация *in vitro* спленоцитов мыши с помощью IFN α A/D

Способность маскированного активируемого IFN α A/D (ProC1023) или нерасщепляемого IFN α A/D стимулировать высвобождение IP-10 в спленоцитах мыши тестировали *in vitro*. IFN α A/D (SEQ ID NO: 481) получали, как описано в Rehberg et al. (Rehberg, et al. Specific molecular activities of recombinant and hybrid leukocyte interferons. J Biol Chem. 1982;257:11497-502), которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Контрольный нерасщепляемый IFN α A/D конструировали путем замены

сайтов расщепления протеазой на нерасщепляемую линкерную последовательность. Маскированный активируемый IFN α A/D активировали *in vitro* путем инкубации с uPA в молярном соотношении 1:250. Спленциты мыши обрабатывали маскированным активируемым IFN α A/D, с обработкой протеазой и без нее, или нерасщепляемым IFN α A/D в течение 24 часов. Уровни IP-10 определяли с помощью стандартного анализа ELISA с использованием обычных способов.

Как показано на Фиг. 21, обработанный uPA маскированный активируемый IFN α A/D индуцировал высвобождение мышинных спленцитов IP-10. Как контрольный нерасщепляемый IFN α A/D, так и маскированный активируемый IFN α A/D без обработки uPA показали сходные уровни стимуляции IP-10, которые были значительно ниже концентрации IP-10, обнаруженной для обработанного uPA маскированного активируемого IFN α A/D. Результаты на Фиг. 21 демонстрируют, что стимуляция высвобождения IP-10 спленцитов мыши условно зависит от активации маскированного IFN α A/D.

Пример 10. Влияние маскированного IFN- α 2b на жизнеспособность клеток хомяка *in vitro*

Жизнеспособность клеток меланомы хомячка RPMI1846 в ответ на обработку маскированной активируемой конструкцией АСС IFN α -2b (ProC732) по сравнению с обработкой ProC732, активированной протеазой uPA, оценивали *in vitro*. Клетки RPMI1846 обрабатывали немаскированной и маскированной АСС в возрастающих концентрациях, как показано на Фиг. 22. Жизнеспособность клеток RPMI1846 определяли с помощью анализа CellTiter Glo (Promega, США) по стандартному протоколу анализа.

Как показано на Фиг. 22, клетки меланомы хомяка RPMI1846 были способны переносить значительно более высокие дозы маскированной активируемой ProC732 по сравнению с немаскированной ProC286. Фрагменты маски на ProC732 вызывали существенный сдвиг жизнеспособности клеток вправо в зависимости от концентрации цитокиновой конструкции. Эти результаты демонстрируют чувствительность клеток хомяка к действию человеческого IFN- α 2b и улучшенную переносимость ProC732 клетками *in vitro*.

ProC1301 (SEQ ID NO: 240) показала устойчивость к активации MMP14 и uPA. Жизнеспособность клеток меланомы хомяка RPMI 1846 снижалась после активации ProC732 с помощью uPA (Фиг. 22). Зависимое от активации снижение жизнеспособности клеток не наблюдали для устойчивой к активации ProC1301 (Фиг. 35C).

Пример 11. Характеристика условно активного INF α -A/D *in vivo*

ProC1023 INF α -A/D с двойной маской и ее модифицированную версию ProC1549 с

потенциально сниженной расщепляемостью получали, как описано в Примере 1.

Противоопухолевую активность маскированного IFNa-A/D тестировали *in vivo* на модели опухоли МС38. Мышам (N=5 на группу) подкожно имплантировали $1,5 \times 10^6$ клеток МС38 в бессывороточной среде. Массу тела и размеры опухоли регистрировали два раза в неделю на протяжении всего исследования. Когда средний объем опухоли достигал 80 мм^3 , мышам два раза в неделю вводили подкожно маскированный IFNa-A/D (ProC1023) или маскированный нерасщепляемый IFNa-A/D (ProC1549) один раз в неделю внутривентриально в указанных дозах.

Маскированный IFNa-A/D проявлял противоопухолевую активность в дозах 50–200 мкг. Введение 50 мкг приводило к значительному ингибированию роста опухоли, тогда как введение 200 мкг также приводило к отторжению опухолей у 60% животных, Фиг. 23А. Противоопухолевый эффект маскированного IFNa-A/D (ProC1023) зависел от протеолитической активации, поскольку нерасщепляемая конструкция (ProC1549) не опосредовала аналогичные ответы, Фиг. 23В.

Маскированный IFNa2b уменьшал объем опухоли при увеличении дозы. Маскированный IFNa2b получили, как описано выше. Маскированный IFNa2b/Fc предотвращал прогрессирование опухоли в дозе 0,02 мг/кг и индуцировал регрессию опухоли в дозе 0,1 мг/кг (Фиг. 32). Как показано на Фиг. 32, маскированный IFNa2b/Fc проявлял противоопухолевую активность, сходную с пегинтерфероном.

Противоопухолевую активность маскированного IFNa-A/D тестировали, как описано выше, с дозами на 1, 4, 8, 11 и 15 дни. Объем опухоли оценивали в моменты времени, указанные на графике Фиг. 27.

Кроме того, маскированный IFNa2b проявлял противоопухолевую активность при 20 мкг и 200 мкг по сравнению с контролем (Фиг. 33). Противоопухолевую активность маскированного IFNa-A/D тестировали, как описано выше, с дозами на 1, 4, 8, 11 и 15 дни. Объем опухоли оценивали в моменты времени, указанные на графике Фиг. 27.

Как показано на Фиг. 33, IFNa AD с двойной маской уменьшал объем опухоли по сравнению с нерасщепляемой версией в дозах 10, 50 и 200 мкг (Фиг. 33).

Как показано на Фиг. 34А, Pro IFNa A/D (ProC1023) ингибировала рост объема опухоли дозозависимым образом. Ингибирование требует активации, как показано на Фиг. 34В), где IFNa A/D NSUB (ProC1549) в дозе 200 мкг продемонстрировал сниженную противоопухолевую активность по сравнению с Pro IFNa A/D (ProC1023) в той же дозе.

Пример 12. Иммунная память у мышей, получавших IFNa-A/D.

Наивным мышам (N=5; рис. 24А) или мышам, которые отторгли опухоль МС38

после лечения IFNa-A/D в дозе 200 мкг ProC1023 (N=3; Фиг. 24B), повторно вводили $1,5 \times 10^6$ клеток MC38 на 56-й день после первоначального лечения. Дважды в неделю отслеживали рост опухоли. Мышей, которые отторгли опухоль после лечения 200 мкг/дозу IFNa-A/D, повторно заражали опухолью MC38 через 56 дней после первоначального лечения. Мышам не проводили никакого лечения в течение периода повторного заражения. После заражения опухоли MC38 постепенно росли у всех пяти контрольных животных (Фиг. 24A), однако только у одной из трех мышей, ранее получавших IFNa-A/D, развилась опухоль, и опухоль у этой мыши росла значительно медленнее, что свидетельствует о формировании противоопухолевой иммунной памяти у этих мышей, которых ранее лечили дозой 200 мкг ProC1023 (Фиг. 24B).

Результаты демонстрируют, что маскированный IFNa-A/D подавляет рост опухоли MC38 зависимым от активации иммуноопосредованным образом.

Пример 13. Зависимая от активации индукция сигнатуры интерферона I типа немаскированным IFN-a2b

INFa-a2b с двойной маской (SEQ ID NO: 321, ProC732) активировали обработкой uPA, как описано ранее. Пегилированный IFN-a2b (Merck, США) приобретали у поставщика.

PBMC от четырех здоровых доноров приобретали у поставщика в виде криоконсервированных суспензий одиночных клеток с жизнеспособностью по меньшей мере 80% после оттаивания. PBMC от каждого донора обрабатывали *in vitro* 1 мкг/мл (высокая доза) маскированного IFN-a2b (нерасщепленной ProC732) или 10 нг/мл маскированного IFN-a2b (нерасщепленной ProC732), немаскированного IFN-a2b (обработанный uPA ProC732), или Peg-IFN-a2b (Sylatron® - Merck, США) в течение 24 часов. Общую мРНК из обработанных клеток подвергали высокопроизводительному РНК-секвенированию спаренных концов длиной 150 нт. Количество попаданий уникальных генов рассчитывали с помощью пакета Subread v.1.5.2. С помощью DESeq2 проведено сравнение экспрессии генов между указанными группами образцов. Критерий Вальда использовали для получения р-значений и логарифмических 2-кратных изменений. Гены с скорректированным р-значением <0,05 и абсолютным log2-кратным изменением >1 называли дифференциально экспрессируемыми генами для каждого сравнения.

Таблица 9. Парное сравнение профилей экспрессии генов

	Без обработки	ProC732	Высокая доза ProC732	ProC732 + uPA	Sylatron (Peg-IFN- a2b)
--	--------------------------	----------------	-------------------------------------	--------------------------	--

Без обработки		↑ 1 ↓ 0	↑ 248 ↓ 36	↑ 418 ↓ 77	↑ 480 ↓ 86
ProC732			↑ 8 ↓ 1	↑ 71 ↓ 10	↑ 125 ↓ 17
Высокая доза ProC732				↑ 1 ↓ 0	↑ 0 ↓ 0
ProC732 + uPA					↑ 0 ↓ 0

Обработка РВМС маскированным IFN-a2b не приводила к изменениям экспрессии генов, в то время как активированный IFN-a2b последовательно активировал и подавлял большое количество генов у всех четырех доноров (**Фиг. 25**). Результаты демонстрируют статистически значимое увеличение экспрессии 418 генов, тогда как экспрессия 77 генов была снижена (**Таблица 9**). Анализ генных онтологий выявил паттерн, связанный с активацией сигналинга интерферона I типа, включая усиление экспрессии известных мишеней IFN-a2b, таких как CXCL10, TRAIL и 2'OAS. Обработка пэгилированным IFN-a2b индуцировало и подавляло одинаковое количество генов для всех доноров. Прямое сравнение профиля экспрессии РВМС, обработанных активированным IFN-a2b и Peg-IFN-a2b, не выявило различий между двумя видами лечения.

Результаты согласуются с зависимой от активации индукцией сигналинга интерферона в первичных иммунных клетках человека с помощью немаскированного IFN-a2b. Минимальные изменения между экспрессией генов, индуцированной высокой дозой маскированного IFN-a2b и немаскированного интерферона, указывают на то, что двойная маскировка снижает сигнальный потенциал цитокина, не создавая новых взаимодействий с рецептором.

Пример 14. Фармакокинетические свойства маскированного IFN-a2b

INFa-a2b с двойной маской (ProC732), стерически маскированный IFN-a2b (SEQ ID NO: 316, ProC440), его нерасщепляемый контроль (ProC659) или слитую молекулу Fc-IFN-a2b (ProC286) вводили золотистым сирийским хомякам, как описано ранее. Образцы крови получали через 6, 24, 72 часа или 7 дней после введения. Концентрацию IFN-a2b измеряли с помощью ELISA (Mabtech, США). Некомпаратментный фармакокинетический анализ проводили с использованием программного обеспечения WinNonlin (Certara, США).

Фармакокинетические профили всех протестированных молекул демонстрируют увеличение концентрации в сыворотке пропорционально введенной дозе (**Фиг. 26**). На

каждом уровне дозы воздействие лекарственного средства было сопоставимо между маскированными IFN-a2b и контрольными белками. Некомпарментальный анализ продемонстрировал, что средний период полужизни в кровотоке составляет 4,3 дня — от 1,98 до 6,38 дня (**таблица 10**).

Результаты указывают на линейные фармакокинетические свойства IFN-a2b in vivo и увеличенный период полужизни по сравнению с опубликованными данными для немодифицированного IFN-a2b (2,3 часа) и Peg-IFN-a2b, конъюгированного с молекулой ПЭГ массой 12 кДа (4,3 часа).

Профили фармакокинетики всех протестированных молекул указывают на увеличение концентрации в сыворотке пропорционально введенным дозам.

Таблица 10. Данные некомпарментного анализа фармакокинетики IFN-a2b

Тестируемое_соединение	Доза	Tmax	Cmax	AUClast	HL_Lambda_z (период полужизни)
	мг/кг	день	нг/мл	день*нг/мл	день
ProC286	0,4	0,25	2913	10371	4,3499
ProC286	2	1	8225	30936	
ProC286	2	1	8863	39595	
ProC286	2	1	7685	29731	
ProC286	10	3	19443	104368	
ProC286	10	1	37673	79286	
ProC286	10	1	24036	118866	
ProC286	15	0,25	41340	187894	1,9774
ProC286	15	1	63075	250384	
ProC286	15	1	74989	259900	
ProC286	15	3	45546	219676	
ProC440	0,4	1	401	1791	4,3952
ProC440	2	1	4718	18986	
ProC440	2	1	7137	27274	
ProC440	2	1	8968	40329	
ProC440	10	1	36860	161885	
ProC440	10	1	31851	152170	

ProC440	15	0,25	53422	214393	5,1186
ProC440	15	1	44331	226428	
ProC440	15	0,25	37551	122954	4,5772
ProC440	15	1	18738	109485	
ProC659	0,4	1	686	3143	5,0481
ProC659	2	3	9842	48705	
ProC659	2	0,25	12284	44567	
ProC659	2	0,25	15715	36674	5,7591
ProC659	10	1	51601	303538	
ProC659	10	1	57389	315392	
ProC659	10	1	51022	241447	
ProC732	10	1	21019	128288	
ProC732	10	1	34498	182458	
ProC732	10	1	34191	179881	
ProC732	15	0,25	33121	186676	6,3841
ProC732	15	1	54723	164326	
ProC732	15	1	27760	157575	
ProC732	15	1	33898	177802	

IFNa2b без маски, с одной и двойной маской и NSUB-контрольный IFNa2b вводили золотистым сирийским хомякам, как описано ранее. Образцы крови получали через 6, 24, 72 часа или 7 дней после введения. Концентрацию IFNa2b измеряли с помощью ELISA (Mabtech, США).

Фармакокинетические профили всех протестированных молекул демонстрируют увеличение концентрации пропорционально введенной дозе (Фиг. 26).

Пример 15. Характеристика иллюстративных универсальных цитокиновых конструкций *in vitro*

Универсальную активируемую цитокиновую конструкцию получали описанными в данном документе рекомбинантными методами. Универсальную АСС имеет последовательность универсального интерферона (ProC1023), обладающую активностью как в клетках человека, так и в клетках мыши. Универсальная АСС представляет собой димер. 1-я и 2-я мономерные конструкции этого АСС были идентичными, каждая из которых представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235, с сигнальной последовательностью на его N-конце. Каждая из 1-й и 2-й

мономерных конструкций содержит от N-конца к C-концу сигнальную последовательность, спейсерную (QSGQ) последовательность (SEQ ID NO: 256), маскирующий пептид IFN-альфа-2b (TDVDYYREWSWTQVS) (SEQ ID NO: 323), линкер (GSSGGS) (SEQ ID NO: 324), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность (LSGRSDNI) (SEQ ID NO: 41), линкер ((GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 227), где n=1), зрелый белок-цитокин, который соответствует молекуле универсального интерферона, представляющей собой гибрид IFN альфа 1 и IFN альфа 2a (SEQ ID NO: 481), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность (LSGRSDNI) (SEQ ID NO: 41), и DD, соответствующий Fc S228P IgG4 человека, укороченный до Cys226 (в соответствии с нумерацией EU) (SEQ ID NO: 3).

Другая универсальная цитокиновая конструкция ProC1549 была получена рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции этого АСС были идентичными, причем каждая из них представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность ProC1549 (имеющий иллюстративную необязательную сигнальную последовательность). Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к C-концу сигнальную последовательность, спейсерную последовательность (например, QSGQ), маскирующий пептид IFN-альфа-2b (TDVDYYREWSWTQVS) (SEQ ID NO: 323), линкер (GSSGGS) (SEQ ID NO: 324), нерасщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211, линкер ((GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 227), где n=1), зрелый белок-цитокин, который соответствует молекуле универсального интерферона, представляющей собой гибрид IFN альфа 1 и IFN альфа 2a (SEQ ID NO: 481), нерасщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность (GGSGGGGS) (SEQ ID NO: 501), и DD, соответствующий Fc S228P IgG4 человека, включая полную шарнирную последовательность (SEQ ID NO: 3). Поскольку в конструкции ProC1549 отсутствуют расщепляемые фрагменты между маскирующим пептидом и цитокином, а также между последовательностью цитокина и DD, она не активируется, как обсуждается ниже.

Другая универсальная активируемая цитокиновая конструкция, ProC859, была получена описанными в данном документе рекомбинантными методами. ProC859 имеет универсальную последовательность интерферона, обладающую активностью как в клетках человека, так и в клетках мыши. ProC859 представляет собой димер. 1-я и 2-я мономерные конструкции этого ProC859 были идентичными, каждая из которых представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность ProC859 с сигнальной последовательностью на его N-конце. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций

содержит от N-конца к C-концу сигнальную последовательность, зрелый белок-цитокин, который соответствует молекуле универсального интерферона, представляющей собой гибрид IFN альфа 1 и IFN альфа 2a (SEQ ID NO: 481), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность (SGRSDNI) (SEQ ID NO: 100), и домен димеризации, соответствующий Fc IgG человека (SEQ ID NO: 3). В отличие от ProC1023, ProC859 не содержит фрагмент, маскирующий пептид.

Активность универсальных цитокиновых конструкций ProC1023 и proC859 тестировали *in vitro* с использованием мышинных клеток меланомы B16. Активность ProC1023 была дополнительно снижена по сравнению с ProC859 (Фиг. 28А). Это указывает на то, что добавление пептидной маски обеспечивало дополнительную силу маскирования, даже несмотря на то, что цитокиновая активность уже была значительно снижена в ProC859 за счет стерического маскирования с помощью доменов димеризации. Неожиданно оказалось, что добавление маскирующего пептида (PM) не мешает стерическому маскированию с помощью DD, а также DD не мешает маскированию с помощью PM. Активация протеазы uPa восстанавливала активность ProC1023 до уровня, сравнимого с уровнем ProC859 после активации протеазы uPa. Это указывает на то, что ProC1023 после активации протеазой восстановила полную активность немаскированного IFN-альфа.

Эффективность маскирования ACC в репортерном анализе НЕК (измеренная путем сравнения EC50 нерасщепленного ACC с EC50 расщепленного ACC) была следующей:

ProC1023: 1387X

ProC859: 700X

Активность универсальных цитокиновых конструкций ProC1023 и ProC1549 тестировали *in vitro* с использованием мышинных клеток меланомы B16. В неактивированном состоянии ProC1023 и ProC1549 продемонстрировали сходное снижение сигнальной активности (Фиг. 28В и 28С). При активации протеазой с помощью uPa или MMP14 активность нерасщепляемого ProC1549 остается низкой и сходной с активностью ProC1549 без активации протеазой, в то время как активность ProC1023 значительно повышается после активации протеазой по сравнению с ProC1023 и ProC1549 без активации протеазой (Фиг. 28В и 28С). Это указывает на то, что ProC1549 устойчив к активации протеазой, и его можно использовать в качестве контроля для демонстрации протеаза-зависимой активации универсальных активируемых цитокиновых конструкций.

Пример 16. Характеристика дополнительных гетеродимерных ACC *in vitro*

ACC ProC1239 (Pro-IFN 49CS 1204 IFNa2b 0 1204 0 G4 Выступ «Заглушка» Впадина)

также получали рекомбинантными способами. 1-я мономерная конструкция этого АСС представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность плеча 1 ProC1239 и сигнальную последовательность на его N-конце. 1-я мономерная конструкция этого АСС содержит от N-конца к C-концу сигнальную последовательность, спейсерную последовательность (QSGQ) (SEQ ID NO: 256), маскирующий IFN-альфа-2b пептид (TDVDYYREWSWTQVS) (SEQ ID NO: 323), линкер (GSSGGS) (SEQ ID NO: 324), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность (LSGRSDNI) (SEQ ID NO: 41), линкер ((GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 227), где n=1), зрелый белок-цитокин, соответствующий человеческому интерферону альфа-2b (SEQ ID NO:1), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность (LSGRSDNI) (SEQ ID NO: 41), и DD, соответствующий Fc IgG человека с мутацией типа «выступ», укороченной до Cys226 (в соответствии с нумерацией EU) (SEQ ID NO: 318). 2-я мономерная конструкция этого АСС представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность плеча 2 ProC1239 и сигнальную последовательность на его N-конце. 2-я мономерная конструкция имеет от N-конца к C-концу сигнальную последовательность, фрагмент в виде «заглушки» (SDNI) (SEQ ID NO: 320) и домен димеризации, соответствующий Fc IgG человека с мутацией по типу «впадины» (SEQ ID NO: 319).

Активность ProC1239 и ProC732 тестировали *in vitro* с использованием чувствительных к IFN клеток HEK293, как описано ранее. Активность ProC1239 была умеренно снижена по сравнению с ProC732 (Фиг. 29).

Пример 17. Характеристика дополнительных АСС с различными расщепляемыми линкерами *in vitro*

Дополнительные активируемые цитокиновые конструкции с различным расщепляемым линкером также получали рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции этих АСС были идентичными. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к C-концу сигнальную последовательность, спейсерную последовательность (QSGQ) (SEQ ID NO: 256), маскирующий IFN альфа-2b пептид (TDVDYYREWSWTQVS) (SEQ ID NO: 323), линкер (GSSGGS) (SEQ ID NO: 324), расщепляемый фрагмент, линкер ((GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 227), где n=1), зрелый белок-цитокин, соответствующий человеческому интерферону альфа-2b (SEQ ID NO: 1), расщепляемый фрагмент и DD, соответствующий Fc S228P IgG4 человека, укороченный до Cys226 (в соответствии с нумерацией EU) (SEQ ID NO: 3). Различные расщепляемые линкеры, используемые в АСС, описаны в следующей таблице:

Активируемые цитокины, имеющие разные расщепляемые линкеры между

Название	Альтернативное название	СМ между СР и РМ	СМ между СР и DD
ProC732	Pro-IFN 49CS 1204 IFNa2b 0 1204 0 (-ESKYGPP (SEQ ID NO: 317)) G4	LSGRSDNI (SEQ ID NO: 41)	LSGRSDNI (SEQ ID NO: 41)
ProC1550	Pro-IFN 49CS 1205 IFNa2b 0 1205 0 (-ESKYGPP (SEQ ID NO: 317)) G4	LSGRSNI (SEQ ID NO: 315)	LSGRSNI (SEQ ID NO: 315)
ProC1552	Pro-IFN 49CS 559 IFNa2b 0 559 0 (-ESKYGPP (SEQ ID NO: 317)) G4	QNQALRMA (SEQ ID NO: 16)	QNQALRMA (SEQ ID NO: 16)

Активность ProC732, ProC1550 и ProC1552 тестировали *in vitro* с использованием чувствительных к IFN клеток HEK293, как описано ранее. При активации протеазой либо uPa, либо MTSP1 все активируемые конструкции цитокинов продемонстрировали одинаковое повышение активности, что указывает на то, что все активированные цитокиновые конструкции восстанавливают тот же уровень активности при обработке протеазой, как показано на Фиг. 30.

Пример 18. Связывание активированного Pb-IFN-a2b с рецепторами альфа-интерферона *in vitro*

Pb-INF-a2b активировали *in vitro* с помощью uPA, и активную фракцию очищали с помощью хроматографии (ProC1640). Рецептор интерферона альфа 1 человека (ProC1822) и яванского макака (ProC1824), а также IFNAR2 человека (ProC1823) и яванского макака (ProC1825) экспрессировали в виде рекомбинантных белков и очищали. Связывание определяли *in vitro* с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса. Лиганды захватывали на чипе, покрытом иммобилизованными антителами к Fc человека или к гистидину. Были установлены условия регенерации, позволяющие проводить измерения многоциклового кинетики. Различные концентрации аналитов пропускались через лиганд-захваченный чип для получения сенсограмм для многоциклового кинетики, которые анализировались для получения кинетических констант скорости и константы аффинности с использованием модели связывания 1:1.

ProC1640 связывается с IFNAR1 человека и яванского макака, однако аффинность и специфичность взаимодействия невозможно определить с помощью известного метода из-

за чрезвычайно медленной диссоциации молекул. Обнаружено связывание активированной фракции IFN-a2b с IFNAR2 человека и IFNAR2 яванского макака. Как показано на Фиг. 41А-41D, ProC732 связывается с рецептором интерферона альфа IFNAR2 человека и яванского макака с аналогичной аффинностью. На Фиг. 41А показан ответ IFNAR1 человека в зависимости от времени. На Фиг. 41В показан ответ IFNAR1 яванского макака в зависимости от времени. На Фиг. 41С показан ответ IFNAR2 человека в зависимости от времени. На Фиг. 41D показан ответ IFNAR2 яванского макака в зависимости от времени.

Аффинность к hIFNAR2 составила 2,7 нМ, яванским макакам – 9,3 нМ, как показано в следующей таблице:

Сводные данные по исследованиям связывания с молекулами IFN-a2b

Лиганд	Аналит	ka (1/М*с)	kd (1/с)	KD (нМ)
ProC1823	ProC1640	4,374E+06	1,195E-02	2,731
ProC1825	ProC1640	2,674E+06	2,501E-02	9,353
ProC1823	ProC1976	8,985E+04	1,175E-02	130,8
ProC1718	ProC1640	5,177E+06	1,214E-02	2,344
ProC440	ProC1718	2,055E+05	2,077E-02	101,1

Для подтверждающих исследований было проанализировано связывание активированного Pb-IFN-a2b (ProC1640) с меченым Fc димерным IFNAR2 (ProC1718). Kd взаимодействия ProC1640 с ProC1718 составила 2,3 нМ.

Следовательно, человеческий IFN-a2b связывается с IFNAR2 человека и яванского макака с аналогичной аффинностью. Формат и валентность лиганда не влияли на результаты измерений.

Пример 19. Связывание молекул Pb-IFN-a2b с одной маской с IFNAR2

Связывание маскированного Pb-INF-a2b с IFNAR2 человека осуществляли, как описано выше. Прямое сравнение маскированного пептидом IFN-a2b (ProC1976) с его немаскированной версией (ProC1640) продемонстрировало ~50-кратную разницу в аффинности (130,8 нМ против 2,7 нМ, соответственно). Кроме того, стерически маскированная молекула (ProC440) связывается с IFNAR2 со значительно сниженной аффинностью (kD = 101,1 нМ) по сравнению с немаскированной молекулой. Как показано на Фиг. 42А-42D, каждая из пептидных масок (Фиг. 42А (без пептидной маски) и Фиг. 42В (маскированная пептидом)) и Fc-маски (Фиг. 42С (без Fc-маски) и 42D (Fc-маскированная)) влияет на связывание АСС с рецептором. Учитывая полученные данные, можно утверждать, что синергетическая активность была получена благодаря применению

двойной маскирующей структуры АСС по настоящему изобретению. Следовательно, как аффинная, так и стерическая маскировка уменьшают связывание IFN-a2b с IFNAR2.

Пример 20. Активация АСС опухолевыми тканями

Флуоресцентно меченный ProC732 инкубировали с ферментативно активными образцами опухоли или низкоактивными контрольными тканями при 37 °С, как показано на Фиг. 37А, как описано в (Howng, B, Winter, MB, LePage, C, et al. Novel Ex Vivo Zymography Approach for Assessment of Protease Activity in Tissues with Activatable Antibodies. *Pharmaceutics* 2021;13:1390). Белки, выделенные через 2 или 16 часов инкубации, анализировали на статус активации (капиллярный электрофорез) и биологическую активность (репортерный анализ НЕК-Blue). Восстановленный раствор затем анализировали с помощью капиллярного электрофореза, позволяющего количественно определить активные молекулы или контрольную ткань с низкой активностью (Фиг. 37В), или с использованием репортерной модели НЕК-blue IFNA (Фиг. 37С). В качестве контрольных тканей использовали ферментативно неактивные образцы. Результаты демонстрируют активацию ProC732 в микроокружении опухоли.

Инкубация с образцами опухоли карциномы молочной железы, но не с контрольными тканями с низкой активностью, приводила к появлению белковых продуктов, соответствующих молекулам, которые, как ожидается, будут генерироваться после высвобождения стерических (фрагмент Fc) и аффинных (пептид CS49) масок (Фиг. 37В). Высвобождение пептидной маски было обнаружено раньше, в то время как отделение Fc-маски было более выраженным в более поздний момент времени. Образцы Pb-IFN-a2b, инкубированные с тканями карциномы молочной железы, но не с контрольными тканями, продемонстрировали повышенную эффективность в анализе активации пути IFN (Фиг. 37С). 16-часовая инкубация привела к более высокой активности по сравнению с 2-часовой.

Наблюдение согласуется с зависимым от времени высвобождением стерических и пептидных масок из молекулы Pb-IFN-a2b и, следовательно, протеолитической активацией Pb-IFN-a2b опухолевыми тканями.

Пример 21. Изменение биоактивности молекул интерферона после инкубации с опухолевыми тканями.

Полностью маскированные белки Pb-INF-a2b (ProC732) или активированные *in vitro* (ProC1640) IFN-a2b инкубировали с образцами опухолей. Белки, выделенные через 2, 6 или 24 часа инкубации, анализировали на биологическую активность с использованием репортерного анализа НЕК-Blue.

Инкубация с ферментативно активными опухолевыми тканями приводила к

активации и усилению биоактивности Pb-IFN-a2b. Напротив, инкубация с опухолевыми тканями снижала биоактивность немаскированного интерферона, возможно, за счет протеолитической деградации молекулы. Биоактивность контрольных образцов как Pb-IFN-a2b, так и немаскированного IFN-a2b не изменилась при инкубации в отсутствие опухоли. Как показано на Фиг. 38А-38С, ProC732 или рекомбинантный IFN-a2b инкубировали на срезах TNBC и ткани опухоли головы и шеи («H&N») или в свободной от опухоли области стекла при 37°C. Полученные растворы затем анализировали с помощью репортерной модели НЕК-Blue IFNA. На Фиг. 38А и 38В показана кратность изменения биологической активности 10 нг/мл ProC732 или 1 нг/мл рекомбинантного IFN-a2b, рассчитанное относительно значений через 0 часов. На Фиг. 38С показана биоактивность белков ProC732 и IFN-a2b, инкубированных в отсутствие опухолевых тканей в течение 24 часов. Каждая линия соединяет отдельный образец (диапазон концентраций 100–0,01 нг/мл), проанализированный до и после 24-часовой инкубации.

Результаты демонстрируют, что воздействие на опухолевые ткани может разрушать немаскированные молекулы интерферона *in vitro*. Маскированный Pb-IFN-a2b сохраняет и усиливает свою биологическую активность после воздействия на опухоль.

Пример 22. Фармакокинетика маскированного INF-a2b и контрольных молекул у приматов, отличных от человека

Для исследования PK/PD свойств Pb-IFN-a2b у яванских макаков, животным (N=2 в группе) вводили однократно подкожно дозу 0,03, 0,3, 3 или 15 мг/кг Pb-IFN-a2b. Образцы плазмы собирали в указанные моменты времени и анализировали с целью определения общей концентрации Pb-IFN-a2b. Концентрации IP-10 в сыворотке измеряли с помощью анализа MesoScale Discovery MSD V-plex.

Введение ProC732 приводило к дозозависимому увеличению концентрации лекарственного средства в плазме, начиная с первого измерения через 24 часа после введения (Фиг. 39). Концентрации Pb-IFN-a2b в плазме сохранялись по меньшей мере в течение 2 недель после введения.

Повышенные концентрации IP-10 в сыворотке были обнаружены у получавших лечение животных уже через 24 часа после введения (Фиг. 40А). Величина увеличения коррелировала с уровнем дозы; введение 15 и 3 мг/кг приводило к концентрации IP-10 выше 8 и 4 нг/мл, соответственно. Через семь дней после введения уровень IP-10 в сыворотке вернулся к физиологической концентрации у всех животных, за исключением обезьян, получавших самую высокую дозу. Концентрации циркулирующих Pb-IFN-a2b и IP-10 нанесены относительно друг друга на 1-й и 7-й день после введения (Фиг. 40В).

Результаты согласуются с увеличенным периодом полужизни Pb-IFN-a2b у приматов, отличных от человека. Временное увеличение IP-10 после лечения высокой дозой Pb-IFN-a2b указывает на то, что молекула может активировать сигнальный путь IFN типа I у приматов, отличных от человека, а затем вводиться в высоких дозах.

Пример 23. Изменения профиля экспрессии генов, индуцированные Pb-IFN-a2b приматами, отличными от человека

Яванских макаков лечили Pb-IFN-a2b, как описано ранее. PBMC выделяли из цельной крови через 24 часа после введения. Были проанализированы изменения профиля экспрессии генов, индуцированные ProC732 у яванских макаков. Яванским макакам (N=2 на группу) вводили подкожно однократную дозу ProC732 в 0,03, 0,3, 3 или 15 мг/кг. Общую мРНК из выделенных клеток подвергали высокопроизводительному РНК-секвенированию спаренных концов длиной 150 нт. Количество попаданий уникальных генов рассчитывали с помощью пакета Subread v.1.5.2. С помощью DESeq2 проведено сравнение экспрессии генов между указанными группами образцов. Критерий Вальда использовали для получения р-значений и логарифмических 2-кратных изменений. Гены с скорректированным р-значением <0,05 и абсолютным кратным изменением >3 называли дифференциально экспрессируемыми генами для каждого сравнения.

Введение Pb-IFN-a2b во всех дозах ассоциировалось с активацией 35 генов в циркулирующих лейкоцитах (Фиг. 43). Экспрессия дополнительного количества генов (3, 12 и 47) повышалась при повышении уровня дозы вводимого Pb-IFN-a2b (0,3, 3 и 15 мг/кг), соответственно. Многие из генов с повышенной экспрессией принадлежат к группе, идентифицированной как ISG, или интерферон-стимулируемые гены, которые, как известно, индуцируются интерферонами I типа. Анализ отдельных генов с повышенной экспрессией показал дозозависимый паттерн индукции, где наиболее очевидные изменения были связаны с максимальным уровнем дозы Pb-IFN-a2b. На Фиг. 44 показаны дозозависимые изменения экспрессии генов. Гены называли дифференциально экспрессированными, если число изменений прочтений составляло > 3.

Результаты согласуются с активацией сигналинга IFN I типа с помощью Pb-IFN-a2b *in vivo*.

Пример 24. Характеристика Pb-IFNa-A/D *in vivo*

Противоопухолевую активность маскированного IFNa-A/D (ProC1023) тестировали *in vivo* на модели опухоли MC38. Мышам (N=10 на группу) подкожно имплантировали $1,5 \times 10^6$ клеток MC38 в бессывороточной среде. Массу тела и размеры опухоли регистрировали два раза в неделю на протяжении всего исследования. Когда средний объем

опухоли достигал 80 мм³, мышам вводили указанные количества ProC1023 путем однократной подкожной инъекции. Ранее нами было установлено, что маскированные IFN α -A/D проявляют противоопухолевую активность в дозах 50–200 мкг. Введение 50 мкг приводило к значительному ингибированию роста опухоли, тогда как введение 200 мкг также приводило к отторжению опухолей у 60% животных. В этом эксперименте животных подвергали эвтаназии через 6 дней после введения, а опухоли, дренирующие опухоль лимфатические узлы и селезенки собирали и перерабатывали в суспензии одиночных клеток. Состав и активацию иммунного инфильтрата из опухолей анализировали с помощью проточной цитометрии, проводимой с использованием всех клеток и гейтированных на жизнеспособные CD45⁺CD3⁺ субпопуляции.

У мышей, получавших Pb-IFN α -A/D, субпопуляция CD8⁺ Т-клеток в микроокружении опухоли (ТМЕ), но не в периферических тканях, демонстрировала усиленную активацию, включая продукцию эффекторных молекул, связанных с противоопухолевой активностью (Фиг. 45). Гранзим В представляет собой эффекторную молекулу цитотоксических Т-клеток, которая может индуцироваться сигналингом интерферона I типа. Введение Pb-IFN α -A/D ассоциировалось со значительным увеличением частоты гранзим-В-положительных и CD69-положительных CD8⁺ Т-клеток в опухолях, в то время как серьезных изменений в периферических тканях, включая дренирующие опухоль лимфатические узлы, не наблюдалось.

Таким образом, данные демонстрируют, что Pb-IFN α -A/D опосредует иммунную активацию в опухоли, но не на периферии. Характер иммунной активации в целом соответствовал описанным эффектам интерферона I типа. Предпочтительный для опухоли способ иммунной активации демонстрирует активацию АСС опухолью посредством протеолитического расщепления. Наблюдение согласуется с иммуноопосредованным механизмом подавления роста опухоли MC38 с помощью Pb-IFN α -A/D.

Пример 25. Переносимость Pb-IFN-a2b *in vivo*

Человеческий IFN α -2b перекрестно реагирует с рецептором IFN α хомяка, и ранее было показано, что он активен у хомяков (Altrock et al, Journal of Interferon Research, 1986). Улучшенная переносимость ProC732 по сравнению со слитым немаскированным IFN-a2b-Fc (ProC286) или одиночным (стерически) маскированным IFN-a2b (ProC440) у хомяков после однократного введения была показана в Примере 2. В этом Примере 25 переносимость Pb-IFN α -2b у сирийских золотых хомяков определяли после многократного введения.

Животным (N=5 на группу) вводили ProC732 в дозе 15 или 30 мг/кг или

немаскированный слитый белок IFN-a2b-Fc (ProC286) в дозе 7,5 или 15 мг/кг, в/б один раз в неделю, всего 3 введения. Клинические наблюдения, массу тела и температуру измеряли до введения дозы, а затем два раза в неделю. У животных, получавших немаскированные молекулы IFN (ProC286), наблюдали значительную потерю массы тела уже через 3 дня после первого введения (Фиг. 46). Первое животное, которому вводили 15 мг/кг ProC286, было подвергнуто эвтаназии на 10-й день из-за чрезмерной потери веса (> 25%), а все остальные животные были либо подвергнуты эвтаназии из-за чрезмерной потери веса, малоподвижности и вялости, либо были найдены мертвыми между 11-м и 19-м днями. Аналогичные наблюдения были сделаны для животных, получавших более низкую (7,5 мг/кг) дозу немаскированного INF-a2b. Напротив, ни у одного из животных, получавших ProC732 в дозе до 30 мг/кг, не наблюдали значительной потери веса или заболеваемости.

Результаты согласуются с повышенной безопасностью Pb-IFN-a2b благодаря использованию двойной маскирующей структуры, используемой в настоящем изобретении.

Пример 26. Снижение высвобождения цитокинов и хемокинов у яванских макаков, которым вводили однократную дозу Pb-IFN-a2b

Чтобы понять эффект маскировки Pb-IFN-a2b у яванских макаков, животных (N=2 в группе) лечили однократным подкожным введением Pb-IFN-a2b (ProC732) в количестве 1 мг/кг немаскированной контрольной молекулы ProC286 в количестве 1 или 0,1 мг/кг. Образцы плазмы собирали в указанные моменты времени и анализировали на концентрации IP-10, MIP-1b и IL-12p70 с использованием мультиплексного анализа MSD V-plex.

Как показано на Фиг. 47, введение ProC732 приводило к повышению уровней IP-10 и MIP-1b в плазме через 6 часов после введения. Концентрации в плазме всех измеренных молекул были выше у животных, получавших немаскированные молекулы в высоких и низких дозах. Через 24 часа после введения у животных, получавших ProC732, было отмечено лишь незначительное повышение IP-10. Напротив, у животных, получавших 1 мг/кг ProC286, наблюдали сильно повышенные уровни IP-10. Повышение IP-10, наблюдаемое через 24 часа после введения 0,1 мг/кг ProC286, было больше, чем повышение, вызванное 10-кратно более высокой дозой ProC732.

Результаты указывают на ослабленную индукцию биомаркеров ответа интерферонов I типа у отличных от человека приматов, получавших ProC732, по сравнению со слитым цитокином-Fc без маски. Наблюдение согласуется с маскирующими эффектами.

Таблица 11. Примеры последовательностей

SEQ ID NO:	Название	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	Интерферон-альфа-2b человека	CDLPQTHSLGSRRTMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKE
2	Линкер	GGGS
3	Область Fc S228P IgG4 человека	CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
4	Область Fc IgG4 человека с мутацией S228P и полным шарниром	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
5	CM	LSGRSDNH
6	CM	TGRGPSWV
7	CM	PLTGRSGG
8	CM	TARGPSFK
9	CM	NTLSGRSENHSG
10	CM	NTLSGRSGNHGS
11	CM	TSTSGRSANPRG
12	CM	TSGRSANP
13	CM	VHMPLGFLGP
14	CM	AVGLLAPP
15	CM	AQNLLGMV
16	CM	QNQALRMA
17	CM	LAAPLGLL
18	CM	STFPFGMF

19	CM	ISSGLLSS
20	CM	PAGLWLDP
21	CM	VAGRSMRP
22	CM	VVPEGRRS
23	CM	ILPRSPAF
24	CM	MVLGRSLL
25	CM	QGRAITFI
26	CM	SPRSIMLA
27	CM	SMLRSMPL
28	CM	ISSGLLSGRSDNH
29	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNH
30	CM	ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH
31	CM	LSGRSGNH
32	CM	SGRSANPRG
33	CM	LSGRSDDH
34	CM	LSGRSDIH
35	CM	LSGRSDQH
36	CM	LSGRSDTH
37	CM	LSGRSDYH
38	CM	LSGRSDNP
39	CM	LSGRSANP
40	CM	LSGRSANI
41	CM	LSGRSDNI
42	CM	MIAPVAYR
43	CM	RPSPMWAY
44	CM	WATPRPMR
45	CM	FRLLDWQW
46	CM	ISSGL
47	CM	ISSGLLS
48	CM	ISSGLL
49	CM	ISSGLLSGRSANPRG
50	CM	AVGLLAPPTSGRSANPRG
51	CM	AVGLLAPPSGRSANPRG

52	CM	ISSGLLSGRSDDH
53	CM	ISSGLLSGRSDIH
54	CM	ISSGLLSGRSDQH
55	CM	ISSGLLSGRSDTH
56	CM	ISSGLLSGRSDYH
57	CM	ISSGLLSGRSDNP
58	CM	ISSGLLSGRSANP
59	CM	ISSGLLSGRSANI
60	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
61	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
62	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
63	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
64	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
65	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNP
66	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANP
67	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANI
68	CM	ISSGLLSGRSDNI
69	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
70	CM	GLSGRSDNHGGAVGLLAPP
71	CM	GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP
72	CM	LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP
73	CM	ISSGLSS
74	CM	PVGYTSSL
75	CM	DWLYWPGI
76	CM	LKAAPRWA
77	CM	GPSHLVLT
78	CM	LPGGLSPW
79	CM	MGLFSEAG
80	CM	SPLPLRVP
81	CM	RMHLRSLG
82	CM	LLAPSHRA
83	CM	GPRSFGL
84	CM	GPRSFG

85	CM	SARGPSRW
86	CM	GGWHTGRN
87	CM	HTGRSGAL
88	CM	AARGPAIH
89	CM	RGPAFNPM
90	CM	SSRGPAYL
91	CM	RGPATPIM
92	CM	RGPA
93	CM	GGQPSGMWGW
94	CM	FPRPLGITGL
95	CM	SPLTGRSG
96	CM	SAGFSLPA
97	CM	LAPLGLQRR
98	CM	SGGPLGVR
99	CM	PLGL
100	CM	SGRSDNI
101	Интерферон альфа-2а человека	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTELYQQLNDEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKE
102	Интерферон альфа-2 крысы	CDLPHTHNLRNKRAFTLLAQMRRRLSPVSLKDRKDFGF PLEKVDGQQIQKAQAIPVLHELTQQILSLFTSKESSTAWD ASLLDSFCNDLQQQLSGLQAACLMQQVGVQESPLTQEDS LLAVREYFHRITVYLREKKHSPCAWEVVRAEVWRALSSS ANLLGRLREERNES
103	Интерферон альфа-2 мыши	CDLPHTYNLRNKRALKVLAQMRRRLPFLSCLKDRQDFGF PLEKVDNQQIQKAQAIPVLRDLTQQTLNLFSTKASSAAW NATLLDSFCN DLHQQLNDLQ TCLMQQVGVQ EPPLTQEDAL LAVRKYFHRITVYLREKKHS PCAWEVVRAE VWRALSSSVN LLPRLSEEKE
104	Интерферон альфа-2b человека	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET

		LLDKFYTELYQQLNDEACVIQGVGVGTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKE
105	Интерферон альфа-п3 человека	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTELYQQLNDEACVIQGVGVGTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKECDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLDDKPHYTELYQQLNDEACVIQGVGVGTETPL MNEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMR SFSLSTNLQESLRSKECDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRR ISLFSCLKDRRDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIF NLFSTKDSSAAWDETLDDKPHYTELYQQLNDEACVIQGV GVGTETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEV VRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
106	Интерферон бета- 1а человека	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNF DIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGW NETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMS SLHLKRYYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFIN RLTGYL RN
107	Интерферон бета- 1б человека	SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNF IPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGW NETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMS SLHLKRYYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFI NRLTGYL RN
108	Интерферон бета мышы	MNNRWILHAAFLLCFSTTALSINYKQLQLQERTNIRKCO ELLEQLNGKINLTYRADFKIPMEMTEKMQKSYTAFAIQE MLQNVFLVFRNNFSSTGWNETIVVRLDELHQQTVFLK TVLEEKQEERLTWEMSSALHLKSYWVQRYLKLMK YNSYAWMVVRAEIFRNFLIIRRLTRNFQN
109	Интерферон бета крысы	MANRWTLHIAFLLCFSTTALSIDYKQLQFRQSTSIRTCQK LLRQLNGRLNLSYRTDFKIPMEVMHPSQMEKSYTAFAIQ VMLQNVFLVFRSNFSSTGWNETIVESLLDELHQQTELLEI

		ILKEKQEERLTWVTSTTTLGLKSYWVRVQRYLKDKKYN SYAWMVVRAEVFRNFSIILRLNRNFQN
110	Интерферон омега человека	MCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRISPFLCLKDRRDFRF PQEMVKGSQLOKAHVMSVLHEMLQQIFSLFHTERSAA WNMTLLDQLHTGLHQQLOHLETCLLQVVGEGESAGAIS SPALTLRRYFQGIRVYLKEKKYSDCAWEVVRMEIMKSL FLSTNMQERLRSKDRDLGSS
111	IL-1 альфа человека	MAKVPDMFEDLKNCYSENEEDSSSIDHLSLNQKSFYHVS YGPLHEGCMDQSVLSISETSKTSKLTFKESMVVATNG KVLKKRRLSLSQSITDDDLEAIANDSEEEIIPRSAPFSFLS NVKYNFMRIIKYEFILNDALNQSIIRANDQYLTAALHN LDEAVKFDMGAYKSSKDDAKITVILRISKTQLYVTAQDE DQPVLLKEMPEIPKTITGSETNLLFFWETHGTKNYFTSVA HPNLFIAATKQDYWVCLAGGPPSITDFQILENQA
112	IL-1 альфа мыши	MAKVPDLFEDLKNCYSENEEDYSSAIDHLSLNQKSFYDAS YGSLHETCTDQFVSLRTSETSKMSNFTFKESRVTVSATSS NGKILKKRRLSFSETFTEDDLQSITHDLEETIQRSAPYTY QSDLRYKLMKLVKQFVMNDSLNTIYQDVDKHYLST TWLNDLQQEVKFDMYAYSSGGDDSKYPVTLKISDSQLF VSAQGEDQPVLLKELPETPKLITGSETDLIFFWKSINSKN YFTSAAYPELFIAATKEQSRVHLARGLPSMTDFQIS
113	IL-1 бета человека	MAEVPPELASEMMAYYSGNEDDLFFEADGPKQMKCSFQ DLDLCPDGGIQLRISDHHYSKGRQAASVVVAMDKLR KMLVPCPQTFQENDLSTFFPFIFEEPIFFDTWDNEAYVH DAPVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDME QQVVFMSFVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKD DKPTLQLESVDPKNYPKKMEKRFVFNKIEINNKLFEFES AQFPNWIYSTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS
114	IL-1 бета мыши	MATVPELNCMPFDSDENDLFFEVDGPQKMKGCFQTF DLGCPDESIQLQISQQHINKSFRQAVSLIVA VEKLVQLPV SFPWTFQDEDMSTFFSFIFEEPIPCDSWDDDDNLLVCDV PIRQLHYRLRDEQQKSLVLSDPYELKALHLNGQNINQQV IFSMSFVQGEPSNDKIPVALGLKGNLYLSCVMKDGTP

		LQLESVDPKQYPKKKMEKRFVFNKIEVKSKVEFESAEPF NWXISTSQAEHKPVFLGNNNGQDIIDFTMESVSS
115	IL-1RA человека	MEICRGLRSHLITLLLFLFHSETICRPSGRKSSKMQAARIW DVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKIDVVPIEPH ALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSNRK QDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVS LTNMPDEGVMVTKFYFQEDE
116	IL-1RA мыши	MEICWGPYSHLISLLLILFHSEAACRPSGKRCKMQAFR IWDTNQKTFYLRNNQLIAGYLQGPNIKLEEKIDMVPIDL HSVFLGIHGGKLCCLSCAKSGDDIKLQLEEVNITDLSKNKE EDKRFTFIRSEKGPPTTSFESAACPGWFLCTTLEADRPVSL TNTPEEPLIVTKFYFQEDQ
117	IL-18 человека	MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLESDFYFG KLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNA PRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFK EMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYF LACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDE
118	IL-18 мыши	MAAMSEDSVCVNFKEMMFIDNTLYFIPEENGDLSDNFG RLHCTTAVIRNINDQVLFVDKRQPVFEDMTDIDQSASEP QTRLIIYMYKDSEVRGLAVTLVSKDSKMSTLSCKNKIISF EEMDPPENIDDIQSDLIFFQKRVPGHNKMEFESSLYEGHF LACQKEDDAFKLILKKEDEGDKSVMFTLTNLHQS
119	IL-2 человека	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLL DLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS
120	IL-2 мыши	MYSMQLASCVTLTLVLLVNSAPTSSSTSSSTAEAQQQQQ QQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLMTF KFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLE DAENFISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDDESATVVDFLR RWIAFCQSIISTSPQ
121	IL-4 человека	MGLTSQLLPPLFFLLACAGNFVHGHKCDITLQEIIKTLNS LTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFCRAATVLRQF

		YSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGL AGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS
122	IL-4 мыши	MGLNPQLVVILLFFLECTRSHIHGCDKNHLREIIGILNEVT GEGTPCTEMDVPNVLTATKNTTESELVCRASKVLRIFYL KHGKTPCLKKNSSVLMELQRLFRAFRCCLDSSISCTMNES KSTSLKDFLESLSKSIMQMDYS
123	IL-7 человека	MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESV LMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGM FLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCT GQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFL KRLLEIKTCWNKILMGTKEH
124	IL-7 мыши	MFHVSFRYIFGIPPLILVLLPVTSSSECHIKDKEGKAYESVL MISIDELDKMTGTDSNCPNNEPNFFRKHVCDDTKEAAFL NRAARKLKQFLKMNISEEFNVHLLTVSQGTQTLVNCTS KEEKNVKEQKKNDACFLKRLLEIKTCWNKILKGS
125	IL-9 человека	MLLAMVLTSAALLCSVAGQGCPFLAGILDINFLINKMQE DPASKCHCSANVTSCCLGIPSDNCTRPCFSERLSQMTNT TMQTRYPLIFSRVKKSVEVLKNNKCPYFSCEQPCNQTTA GNALTFLKSLLEIFQKEKMRGMRGKI
126	IL-9 мыши	MLVTYILASVLLFSSVLGQRCSTTWGIRDNTNYLIENLKD DPPSKCSCSGNVTSCLCLSVPTDDCTTPCYREGLLQLTN ATQKSRLLPVFHRVKRIVEVLKNITCPSFSCEKPCNQTM AGNTLSFLKSLLGTFQKTEMQRQKSRP
127	IL-13 человека	MHPLLNPLLLALGLMALLTTVIALTCLGGFASPGPVPPS TALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCA ALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVR DTKIEVAQFVKDLLHLKCLFREGFRN
128	IL-13 мыши	MALWVTAVLALACLGLAAPGPVPRSVSLPLTLKELIEE LSNITQDQTPLCNGSMVWSVDLAAGGFCVALDSLNTNISN CNAIYRTQRILHGLCNRKAPTTSVSSLPDTKIEVAHFITKL LSYTKQLFRHGPF
129	IL-15 человека	MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSA GLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVH PSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLILANN

		SLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TS
130	IL-15 мышцы	MKILKPYMRNTSISCYLCFLLNHFLTEAGIHVFILGCVS VGLPKTEANWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLTYTDSDFHP SCKVTAMNCFLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLAN STLSSNKNVAESGCKECEEELEKTFTEFLQSFIRIVQMFIN TS
131	IL-3 человека	MSRLPVLLLLQLLVRPGLQAPMTQTTPPKTSWVNCNSM IDEIITHLKQPPLPLDFNNLNGEDQDILMENNLRPNLE AFNRAVKSLQNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIK DGDWNEFRRKLT FYLKTLENAQAQQTTL SLAIF
132	IL-3 мышцы	MVLASSTTSIHTMLLLLLMLFHLGLQASISGRDTHRLTRT LNCSSIVKEIIGKLPPELKT DDEGPSLRNKSFRRVNLSKF VESQGEVDPEDRYVIKSNLQKLNCCLP TSANDSALPGVF IRDLDDFRKKLRFYMVHLNDLETVLT SRPPQPASGSVSP NRGTVEC
133	IL-5 человека	MRMLLHLSLLALGAAYVYAIPTEIPTSALVKETLALLST HRTLLIANETLRIPVPVHKNHQLCTEEIFQGIGTLESQTVQ GGTVERLFKNLSLIKKYIDGQKKKCGEERRRVNQFLDYL QEFLGVMNTEWIIES
134	IL-5 мышцы	MRRMLLHLSVLTLSCVWATAMEIPMSTVVKETLTQLSA HRALLTSNETMRLPVPVTHKNHQLCIGEIFQGLDILKNQT VRGGTVEMLFQNLSLIKKYIDRQKEKCGEERRRTRQFLD YLQEFLGVMSTEWAMEG
135	GM-CSF человека	MWLQSLLLLGTVAC SISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEA RRLNL SRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLEL YKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHC PPTPETSCATQI ITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE
136	GM-CSF мышцы	MWLQNLLFLGIVVYSL SAPTRSPITVTRPWKHVEAIKEA LNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKLTCVQTRLKIFEQ GLRGNFTKLKGALNMTASY YQTYCPPTPETDCETQVTT YADFIDSLKTFLTDIPFECKKPGQK
137	IL-6 человека	MNSFSTSAFGPVAFSLG LLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDV AAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDG ISALRKETCNKSNMCE

		SSKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEETCLVKIITG LLEFEVYLEYLQNRFESEEQARAVQMSTKVLIQFLQKK AKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILR SFKEFLQSSLRALRQM
138	IL-6 мышцы	MKFLSARDFHPVAFLGLMLVTTTAFPTSQVRRGDFTEdT TPNRPVYTTSQVGGILITHVLWEIVEMRKELCNGNSDCM NNDDALAENNLKLPEIQRNDGCYQTGYNQEICLLKISSG LLEYHSYLEYMKNLKDKNKKDKARVLQRDTETLIHIFN QEVKDLHKIVLPTPISNALLTDKLESQKEWLRTKTIQFIL KSLEEFKVTLRSTRQT
139	IL-11 человека	MNCVCRLVLVVLSPWPTAVAPGPPPGPPRVSPDPRAEL DSTVLLTRSLADTRQLAAQLRDKFPADGDHNLDSLPTL AMSAGALGALQLPGVLRRLRADLLSYLRHVQWLRRAG GSSLKTLEPELGTQARLDRLRLQLLMSRLALPQPPPD PPAPPLAPPSSAWGGIRAAHAILGGLHLTLDWAVRGLL LKTRL
140	IL-11 мышцы	MNCVCRLVLVVLSPWDRVVAPGPPAGSPRVSSDPRAEL LDSAVLLTRSLADTRQLAAQMRDKFPADGDHSLDSLPL TLAMSAGTLGSLQLPGVLRRLRVDLMSYLRHVQWLRR AGGPSLKTLEPELGTQARLERLLRLQLLMSRLALPQA APDQPVIPPLGPPASAWGSIRAAHAILGGLHLTLDWAVRG LLLLKTRL
141	G-CSF человека	MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPAS SLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVSECATYKLCH PEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSGLHSGLF LYQGLLQALEGISPELGPDLTLDLQDVADFATTIWQQME ELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSF LEVSYRVLRLHLAQP
142	G-CSF мышцы	MAQLSAQRRMKLMALQLLLWQSALWSGREAVPLVTVS ALPPSLPLPRSFLKSLQVRKIQASGSVLEQLCATYKL CHPEELVLLGHSLGIPKASLSGCSSQALQQTQCLSGLHSG LCLYQGLLQALSGISPALAPTLDLLQLDVANFATTIWQQ MENLGVAPTQPTQSAMPAFTSAFQRRAGGVLAISYLQ GFLETARLALHLA

143	IL-12 альфа человека	MCPARSLLLVATLVLLDHLNLPVATPDPGMFPCLH HSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCSTSEEIDHEDITKDK TSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSF MMALCLSSIIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKL CILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
144	IL-12 бета человека	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWY PDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTI QVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTD ILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWTITSTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVE CQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSL TFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYSSSSWSEWASVPCS
145	IL-12 бета мыши	MCPQKLTIWFVAILLVSPMLMAMWELEKDVYVVEVDW TPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSQRHGVIGSGKTLTI TVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGWSTEI LKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLQQRNMDLKFNIK SSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLQQRDYEKYSVSCQE DVTCPATAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIKPD PPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFV RIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNV CVQAQDRYNNSSCSKWACVPCRVR
146	IL-12 альфа мыши	MCQSRYLLFLATLALLNHLNLPVATPDPGMFPCLH LLKTTDDMVKTAREKLNHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTL KTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPQKTSMMT LCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGML VAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCIL LHAFSTRVVTINRVMGYLSSA
147	LIF человека	MKVLAAGVVPVLLVLHWKHGAGSPLPITPVNATCAIRH PCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEFPNPN LDKLCGPNVTDPPFHANGTEKAKLVELYRIVVYLGTSL GNITRDQKILNPSALSLHSLNATADILRGLLSNVLCRLC

		SKYHVGHVDTVYGPDTSGKDV FQKKKLG CQLLGKYKQ IIAVLAQAF
148	LIF мышцы	MKVLAAGIVPLLLLVLHWKHGAGSPLPITPVNATCAIRH PCHGNLMNQIKNQLAQLNGSANALFISYYTAQGEPPFNN VEKLCAPNMTDFPSFHGNGTEKTKLVELYRMVAYLSAS LTNITRDQKVLNPTAVSLQVKLNATIDVMRGLLSNVLCR LCNKYRVGHVDVPPVPDHS DKEAFQRKKLGCQLLGT Y KQVISVVVQAF
149	OSM человека	MGVLLTQR TLLSLVLALLFPSMASMAAIGSCSKEYRVLL GQLQKQTDLMQDTSRLLDPYIRIQGLDVPKLRHCRERP GAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQRL PKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRNNIYCMAQL LDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFL HGYHRFMHSVGRVFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGV RRTRPSRK GKRLMTRGQLPR
150	OSM мышцы	MQTRLLR TLLSLTLLSLLILSMALANRGCSNSSS QLLSQLQ NQANLTGNTE SLEPYIRLQNLNTPDLRAACTQH SVAFP SEDTLRQLSKPHFLSTVYTTLDRVLYQLDALRQKFLKTP AFPKLDSARHNILGIRNNVFCMARLLNHSLEIPEPTQTDS GASRSTTPDVFN TKIGSCGFLWGYHRFMG SVGRVFRE WDDGSTRSRRQSPLRARRKGT RRIRVRHKGTRRIRVRRK GTRRIWVRRKGSRKIRPSRSTQSPTTRA
151	IL-10 человека	MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPN MLRDLRDAFSRVKTF FQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGY LGCQALSEMIQFY LEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGEN LKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGI YKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
152	IL-10 мышцы	MPGSALLCCLLLL TGMRISRGQYSREDNNCTHFPVGQSH MLLELRTAFS QVKTF FQTKDQLDNILLTDSL MQDFKGYL GCQALSEMIQFY LVEVMPQAEKHGPEIKEHLNSLGEK LK TLRMRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKSDFNKLQDQGVY KAMNEFDIFINCIEAYMMIKMKS
153	IL-20 человека	MKASSLAFSLLSAFYLLWTPSTGLKTLNLGSCVIATNL QEIRNGFSEIRGSVQAKDGNIDIRILRRTESLQDTKPANRC

		CLLRHLLRLYLDRVFKNYQTPDHYTLRKISSLANSFLTIK KDLRLCHAHMTCHCGEEAMKKYSQILSHFEKLEPQAAV VKALGELDILLQWMEETE
154	IL-20 мыши	MKGFGLAFGLFSAVGFLWTPLTGLKTLHLGSCVITANL QAIQKEFSEIRDSVQAEDTNIDIRILRTTESLKDIKSLDRC CFLRHLVRFYLDRVFKVYQTPDHHTLRKISSLANSFLIIK KDLSVCHSHMACHCGEEAMEKYNQILSHFIELELQAAV VKALGELGILLRWMEEML
155	IL-14 человека	MKNQDKKNGAAKQSNPKSSPGQPEAGPEGAQERPSQA APAVEAEGPGSSQAPRKPEGAQARTAQSGALRDVSEELS RQLEDILSTYCVDNNQGGPGEDGAQGEPAEPEDAEEKSRT YVARNGEPEPTPVVNGEKEPSKGDPNTEEIRQSDEVGDR DHRRPQEKKKAKGLGKEITLLMQLNLTLSTPEEKLAALC KKYAEELLEHRNSQKQMKLLQKKQSQLVQEKDHLRGE HSAVLARSKLESLELQRELQRHNRSLKEEGVQRAREEEEE RKEVTSHFQVTLNDIQLQMEQHNERNSKLRQENMELAE RLKKLIEQYELREEHIDKVFHKDLQQQLVDAKLQQAQ EMLKEAEERHQREKDFLLKEAVESQRMCELMKQQETH LKQQLALYTEKFEFQNTLSKSSEVFTTFKQEMEKMTKK IKKLEKETMYRSRWESSNKALLEMAEEKTVRDKELEG LQVKIQRLEKLCRALQTERNDLNKRVDLSAGGQGSALT DSGPERRPEGPGAQAPSSPRVTEAPCYPGAPSTEASGQT GPQEPTSARA
156	IL-14 мыши	MKNQDKKNGPAKHSNSKSGSPGQREAGPEGAHGRPRQT APGAEAEGSTSQAPGKTEGARAKAAQPGALCDVSEELS RQLEDILSTYCVDNNQGGPAEEGAQGEPTPEDTEKSRT YAARNGEPEPGIPVVNGEKETSKGEPGTEEIRASDEVGD RDHRRPQEKKKAKGLGKEITLLMQLNLTLSTPEEKLAAL CKKYAEELLEHRNSQKQMKLLQKKQSQLVQEKDHLRG EHSKAVLARSKLESLELQRELQRHNRSLKEEGVQRAREEEEE KRKEVTSHFQVTLNDIQLQMEQHNERNSKLRQENMELA ERLKKLIEQYELREEHIDKVFHKDLQQQLVDAKLQQA QEMLKEAEERHQREKEFLLKEAVESQRMCELMKQQET HLKQQLALYTEKFEFQNTLSKSSEVFTTFKQEMEKMTK

		KIKKLEKETTMYRSRWESSNKALLEMAEEKTVRDKELE GLQVKIQRLEKLCRALQTERNDLNKRVDLTDAGGITDIG SERRPEATTASKEQGVESPGAQPASSPRATDAPCCSGAPS TGTAGQTGPGEPTPATA
157	IL-16 человека	MESHSRAGKSRKSAKFRSISRSLMLCNAKTSDDGSSPDE KYPDPFEISLAQGKEGIFHSSVQLADTSEAGPSSVPLAL ASEAAQLQAAGNDRGKTCRRIFFMKESSTASSREKPGKL EAQSSNFLFPKACHQRARSNSTSVNPNYCTREIDFPMTHK SAAPTDRQPYSLCSNRKSLSQQLDCPAGKAAGTSRPTRS LSTAQLVQPSGGLQASVISNIVLMKGQAKGLGFSIVGGK DSIYGPIGIYVKTIFAGGAAAADGRLQEGDEILELNGESM AGLTHQDALQKFKQAKKGLLTLTVRTRLTAPPSLCSHLS PPLCRSLSSSTCITKDSSSFALESAPSAPISTAKPNYRIMVEV SLQKEAGVGLGIGLCSVPYFQCISGIFVHTLSPGSVAHLD GRLRCGDEIVEISDSPVHCLTLNEVYTILSHCDPGPVPIIV SRHPDPQVSEQQLKEAVAQAVENTKFGKERHQWSLEGV KRLESSWHGRPTLEKEREKNSAPPHRAQKVMIRSSSDS SYMSGSPGGSPGSGSAEKPSDVIDISTHSPSLPLAREPVV LSIASSRLPQESPPLPESRDSHPPLRLKKSFEIVRKPMSSKP KPPPRKYFKSDSDPQKSLEERENSSCSSGHTPPTCGQEAR ELLPLLLPQEDTAGRSPSASAGCPGPGIGPQTKSSTEGERP GWRRASPVTQTSPIKHPLLKRQARMDDYSFDTTAEDPWV RISDCIKNLFSPIMSENHGHMPLQPNASLNEEEGTQGHPD GTPPKLDTANGTPKVYKSADSSTVKKGPPVAPKPAWFR QSLKGLRNRASDPRGLPDPALSTQPAPASREHLGSHIRAS SSSSSIRQRISSEFETFGSSQLPDKGAQRLSLQPSSGEAAKP LGKHEEGRFSGLLGRGAAPTLVPQQPEQVLSSGSPAASE ARDPGVSESPPPGRQPNQKTLPPGPDLLRLLSTQAEESQ GPVLKMPSQRARSFPLTRSQSCETKLLDEKTSKLYSISSQ VSSAVMKSLCLPSSISCAQTPCIPKEGASPTSSSNEDSAA NGSAETSALDTGFSLNLSELREYTEGLTEAKEDDDGDHS SLQSGQSVISLLSSEELKKLIEEVKVLDEATLKQLDGIHV TILHKEEGAGLGFSLAGGADLENKVITVHRVFPNGLASQ EGTIQKGNVLSINGKSLKGTTHHDALAILRQAREPRQA

		VIVTRKLTPEAMPDLNSSTDSAASASAASDVSVESTAEA TVCTVTLEKMSAGLGFSLGEGKSLHGDKPLTINRIFKG AASEQSETVQPGDEILQLGGTAMQGLTRFEAWNIKALP DGPVTIVIRKSLQSKETTAAGDS
158	IL-16 мьши	MEPHGHSGKSRKSTKFRSISRSLILCNAKTSDDGSSPDEK YDPDFETSLCQGKEGFFHSSMQLADTFEAGLSNIPDLALA SDSAQLAAAGSDRGKHCRKMFFMKESSTSSKEKSGKP EAQSSSFLPKACHQRTRSNSTSVNPYSAGEIDFPMTKKS AAPTDRQPYSLCSNRKSLSQQLDYPILGTARPTRSLSTAQ LGQLSGGLQASVISNIVLMKGQAKGLGFSIVGGKDSIYG PIGIYVKSIFAGGAAAADGRLQEGDEILELNGESMAGLT HQDALQKFKQAKKGLLTLTVRTRLTPPSLCSHLSPLC RSLSSSTCGAQDSSPFSLESPASPASTAKPNYRIMVEVSL KKEAGVGLGIGLCSIPYFQCISGIFVHTLSPGSVAHLDGR LRCGDEIVEINDSPVHCLTLNEVYTILSHCDPGVPPIIVSR HPDPQVSEQQLEAVAQAVEGVKFGKDRHQWSLEGVK RLESSWHGRPTLEKEREKHSAPPHRAQKIMVRSSSDSS YMSGSPGGSPCSAGAEPQPSEREGSTHSPSLSPGEEQPC PGVPSRPQQESPPLPESLERESHPPRLKKSFEILVRKPTSS KPKPPPRKYFKNDSEPQKKLEEKEKVTDPGHTLPTCSQ ETRELLPLLLQEDTAGRAPCTAACCPGPAASTQTSSSTEG ESRRSASPETPASP GKHP LLKRQARMDYSFDITAEDPWV RISDCIKNLFSPIMSENHSHTPLQPNTSLGEEDGTQGCEG GLSKMDAANGAPRVYKSADGSTVKKGPPVAPKPAWFR QSLKGLRNRAPDPRRPPEVASAIQPTPVSRDPPGPQPQAS SSIRQRISSENFENFGSSQLPDRGVQRLSLQPSSGETTKFPGK QDGGFRFSGLLGQGATVTAKHRQTEVESMSTTFPNSSEV RDPGLPESPPPQRPSTKALSPDPLLRLTTQSEDTQGPG LKMPSQRARSFPLTRTQSCETKLLDEKASKLYSISSQLSS AVMKSLCLPSSVSCGQITCIPKERVSPKSPCENNSSAAEG FGEAMASDTGFSLNLSELREYSEGLTEPGETEDRNHCSS QAGQSVISLLSAEELKLIIEVRVLDEATLKQLDSIHVTIL HKEEGAGLGFSLAGGADLENKVITVHRVFPNGLASQEG TIQKGNEVLSINGKSLKGATHNDALAILRQARDPRQAVI

		VTRRTTVEATHDLNSSTDSAASASAASDISVESKEATVC TVTLEKTSAGLGFSLGEGKGSLSHGDKPLTINRIFKGTEQG EMVQPGDEILQLAGTAVQGLTRFEAWNVIKALPDGPVTI VIRRTSLQCKQTTASADS
159	IL-17 человека	MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGPCNSEDKNF PRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYNNRSTSPWNLHRN EDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQ EILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA
160	IL-17 мыши	MSPGRASSVSLMLLLLLSLAATVKAAAIPQSSACPNTTEA KDFLQNVKVNKVFNSLGAKVSSRRPSDYLNRRSTSPWT LHRNEDPDRYPSVIWEAQCRHQRCVNAEGKLDHHMNS VLIQQEILVLKREPESCPFTFRVEKMLVGVGCTCVASIVR QAA
161	CD154 человека	MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSA LFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSL SLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQ NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLEN GKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLK SPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGAS VFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL
162	CD154 мыши	MIETYSQSPRSVATGLPASMKIFMYLLTVFLITQMIGSV LFAVYLHRRLDKVEEEVNLHEDFVFIKKLKRCKNGEGSL SLLNCEEMRRQFEDLVKDITLNKEEKENSFEMQRGDE DPQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGYTMSNNLVTLEN ENKQLTVKREGLYYVYTQVTFCSNREPSSQRPFIVGLW LKPSSGSERILLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFELQA GASVFNVTTEASQVIHRVGFSSFGLLKL
163	LT-бета человека	MGALGLEGRGGRLQGRGSLLLAVAGATSLVTLLAVPI TVLAVLALVPQDQGGVLTETADPGAQAQQGLGFQKLPE EEPETDLSPGLPAAHLIGAPLKGQGLGWETTKEQAF LTS GTQFSDAEGALPQDGLYYLYCLVGYRGRAPPGGGDPQ GRSVTLRSSLYRAGGAYGPGTPELLEGAETVTPVLDPA RRQGYGPLWYTSVGFGLVQLRRGERVYVNISHPDMV DFARGKTFFGAVMVG

164	LT-бета мыши	MGTRGLQGLGGRPQGRGCLLLAVAGATSLVTLLLAVPI TVLAVLALVPQDQGRRVEKIIGSGAQAQKRLDDSKPSCI LPSPSSLSETPDPRRLHPQRSNASRNLASTSQGPVAQSSRE ASAWMTILSPAADSTPDPGVQQLPKGEPETDLNPELPAA HLIGAWMSGQGLSWEASQEEAFLRSGAQFSPHGLALP QDGVYYLYCHVGYRGRTPPAGRSRARSLLRSALYRAG GAYGRGSPPELLLEGAETVTPVVDPIGYGSLWYTSVGFGG LAQLRSGERVYVNISHPDMVDYRRGKTFFGAVMVG
165	TNF-альфа человека	STEMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIV AGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLISPLAQAVRSSSR TPSDKPVAVVANPQAEGLQWLNRANALLANGVEL RDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGPCSTHVLLTHTISR AVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLG VFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
166	TNF-альфа мыши	NHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNLVVPADGL YLVYSQVLFKGQGPCDYVLLTHTVSRFAISYQEKVNLLS AVKSPCKDTPEGAEAKPWYEPIYLGGFQLEKGDQLSA EVNLPKYLDFAESGQVYFGVIAL
167	TNF-бета человека	MTPPERLFLPRVCGTTLHLLLGLLLVLLPGAQGLPGVG LTPSAAQTARQHPKMHLAHSTLKPA AHLIGDPSKQNSLL WRANTDRAFLQDGFSLSNNSLLVPTSGIYFVYSQVVFSG KAYSPKATSSPLYLAHEVQLFSSQYPFHVPLLSSQKMVY PGLQEPWLHSMYHGA AFQLTQGDQLSTHTDGIPHLVLS PSTVFFGAFAL
168	4-1BBL человека	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLL LLLAACAVALACPWAVSGARASPGSAASPRREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVYVFFQLELRRV AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
169	4-1BBL мыши	MDQHTLDVEDTADARHPAGTSCPSDAALLRDTGLLADA ALLSDTVRPTNAALPTDAAYPVAVNVRDREAAWPPALNF CSRHPKLYGLVALVLLLLIAACVPIFTRTEPRPALTTITSP

		NLGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQQGSPVFAKLLAKN QASLCNTTLNWHSQDGAGSSYLSQGLRYEEDKKELVVD SPGLYYVFLELKLSPTFTNTGHKVQGWVSLVLQAKPQV DDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLLKAGHRL SVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTTSFGLFLVKPDNP WE
170	APRIL человека	AVLTQKQKKQHSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPA LRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTM GQVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVF HLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHGTFLGFVKL
171	APRIL мыши	MPASSPGHMGGSVREPALSVALWLSWGAVLGAVTCAV ALLIQQTEQLSLRREVSRLQRSGGPSQKQGERPWQSLWE QSPDVLEAWKDGAKSRRRAVLTQKHKKKHSVLHLVP VNITSKADSDVTEVMWQPVLRGRGLEAQGDIVRVWD TGIYLLYSQVLFHDVTFTMGQVVSREGQGRRETLFR CIR SMPSDPDRAYNSCYSAGVFLHQGDIITVKIPRANAKLS LSPHGTFLGFVKL
172	CD70 человека	MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRALVPLVAGLVICLVVCIQ RFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQ GGPALGRSFLHGPELDKQQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICS STTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQR LTPLARGDTLCTNLGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP
173	CD70 мыши	MPEEGRPCPWVRWSGTAFQRQWPWLLL VVFITVFCCW FHCSGLLSKQQQRLLHPEPHTAELQLNLTVPRKDPTLR WGAGPALGRSFTHGPELEEGHLRIHQDGLYRLHIQVTLA NCSSPGSTLQHRATLAVGICSPA AHGISLLRGRFGQDCTV ALQRLTYLVHGDVLCNLTLPLLPSRNADETFFGVQWIC P
174	CD153 человека	MDPGLQQALNGMAPPGDTAMHVPAGSVASHLGTTSRS YFYLTATLALCLVFTVATIMVLVVQRTDSIPNSPDNVPL KGGNCSEDLKILKRAPFKKSWAYLQVAKHLNKTCLSW NKDGILHGVRYQDGNLVIQFPGLYFICQLQFLVQCPNNS VDLKELELINKHIKKQALVTVCESGMQTKHVYQNL SQF LLDYLVQVNTTISVNVDTFQYIDTSTFPLENVLSIFLYSNSD

175	CD153 мьши	MEPGLQQAGSCGAPSPDPAMQVQPGSVASPWRSTRPWR STSRSYFYLSTTALVCLVVAVAIILVLVVQKKDSTPNTTE KAPLKGGNCSEDLFCTLKSTPSKKSWAYLQVSKHLNNT KLSWNEDGTIHLIYQDGNLIVQFPGLYFIVCQLQFLVQ CSNHSVDLTLQLLINSKIKKQTLVTVCESGVQSKNIYQNL SQFLLHYLQVNSTISVRVDNFQYVDTNTFPLDNVLSVFL YSSSD
176	CD178 человека	MQQPFNYPYPQIYWVDSSASSPWAPPGTVLPCTSVPRR PGQRRPPPPPPPLPPPPPPPLPPLPLPPLKKRGNHSTGL CLLVMFFMVLVALVGLGLGMFQLFHLQKELAELRESTS QMHTASSLEKQIGHPSPPPEKKELRKVAHLTGKSNSRSM PLEWEDTYGIVLLSGVKYKKGGLVINETGLYFVYSKVYF RGQSCNNLPLSHKVYMRNSKYPQDLVMMEGKMMSYC TTGQMWARSSYLGAVFNLTSADHLYVNVSELSLVNFEE SQTFFGLYKL
177	CD178 мьши	MQQPMNYPQIFWVDSSATSSWAPPGSVFPCPSCGPRG PDQRRPPPPPPVSPPLPPSQPLPLPPLTPLKKKDHNTNLW LPVVFFMVLVALVGMGLGMYQLFHLQKELAELREFTN QSLKVSSFEKQIANPSTPSEKKEPRVAHLTGNPHSRSIPL EWEDTYGTALISGVKYKKGGLVINETGLYFVYSKVYFR GQSCNNQPLNHKVYMRNSKYPEDLVMEEKRLNYCTT GQIWAHSSYLGAVFNLTSADHLYVNISQLSLINFEEKTF FGLYKL
178	GITRL человека	MTLHPSPITCEFLFSTALISPKMCLSHLENMPLSHSRTQG AQRSSWKLWLFCSIVMLLFLCSFSWLIFIFLQLETAKEPC MAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYL IYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQ NVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGILLANP QFIS
179	GITRL мьши	MEEMPLRESSPQRAERCKKSWLLCIVALLMLLCSLGTL IYTSLKPTAIESCMVKFELSSSKWHMTSPKPHCVNTTSD GKCLKILQSGTYLIYGQVIPVDKKYIKDNAPFVVQIYKKN DVLQTLMNDFQILPIGGVYELHAGDNIYLFNSKDHQK TNTYWGIIIMPDLPFIS

180	LIGHT человека	MEESVVRPSVFVVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCSVARVG LGLLLLLMGAGLAVQGWFLQLHWRLGEMVTRLPDGP AGSWEQLIQERRSHEVNPA AHLTGANSSLTGSGGPLLW ETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGV GCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATS SSRVVWDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVLDERLVRLRD GTRSYFGAFMV
181	LIGHT мыши	MESVVQPSVFVVDGQTDIPFRRLEQNHRRRRCGTVQVS LALVLLLGAGLATQGWFLRLHQRLGDIVAHLPDGGKG SWEKLIQDQRSHQANPA AHLTGANASLIGIGGPLLWETR LGLAFLRGLTYHDGALVTMEPGYYYVYSKVQLSGVGC QGLANGLPITHGLYKRTSRYPKELELLVSRRSPCGRANS SRVVWDSSFLGGVVHLEAGEE VVVRVPGNRLVRPRDG TRSYFGAFMV
182	OX40L человека	MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGLGLLLC FTYICLHFSALQVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQ KEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYSQEVNLSLHYQ KDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTDDNT SLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
183	OX40L мыши	MEGEGVQPLDENLENGSRPRFKWKKTLRLVVSIGKAG MLLCFIYVCLQLSSSPAKDPPIQRLRGAVTRCEDGQLFIS SYKNEYQTMEVQNNSVVIKCDGLYIYLKGSFFQEVKID LHFREDHNPISIPMLNDGRRIVFTVVASLAFKDKVYLT NAPDTLCEHLQINDGELIVVQLTPGYCAPEGSYHSTVNQ VP
184	TALL-1 человека	MDDSTEREQSRLTSCLKKREEMKLKECVSILPRKESPSV RSSKDGKLLAATLLLALLSCCLTVVSFYQVAALQGD LASLRAELQGHHA EKLPAGAGAPKAGLEEAPAVTAGLKIFEP PAPGEGNSSQNSRNKRAVQGPEETVTQDCLQLIADSETP TIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAL EEEKENKILVKETGYFFIY GQVLYTDKTYAMGH LIQRKKVHVFGDEL SVTLFRCIQ NMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDG DVTFFGALKLL

185	TALL-1 мыши	MAMAFCPKDQYWSSRKSCVSCALTCSQRSQRTCTDFC KFINCRKEQGRYYDHLLGACVSCDSTCTQHPQQCAHFC EKRRRSQANLQPELGRPQAGEVEVRSDNSGRHQGSEHG PGLRLSSDQLTYCTLGVCLCAIFCCFLVALASFLRRRGE PLPSQPAGPRGSQANS PHAHRPVTEACDEVTASPQPVET CSFCFPERSSTQESAPRSLGIHGFAGTAAPQPCMRATVG GLGVLRASTGDARPAT
186	TRAIL человека	MAMMEVQGGPSLGQTCVLIVIFTVLLQSLCVAVTYVYF TNELKQM QDKYSKSGIACFLKEDDSYWDPNDEESMNSP CWQVKWQLRQLVRKMILRTSEETISTVQEKQQNISPLVR ERGPQRVA AHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSW ESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQE EIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMK SARNSCWS KDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHE ASFFGAFLVG
187	TRAIL мыши	MPSSGALKDLSFSQHFRMMVICIVLLQVLLQAVSVAVTY MYFTNEMKQLQDNYSKIGLACFSKTDEDFWDSTDGEIL NRPCLQVKRQLYQLIEEVTLRTFQDTISTVPEKQLSTPPL PRGGRPQKVA AHITGITRRSNSALIPISKDGKTLGQKIES WESSRKGHSFLNHVLFNRNGELVIEQEGLYYIYSQTYFRF QEAEDASKMVSKDKVRTKQLVQYIYKYTSYPDPIVLMK SARNSCWSRDAEYGLYSIYQGGFLFELKKNDRIFVSVTNE HLMDLDQEASFFGAFLIN
188	TWEAK человека	MAARRSQRRRGRRGEPGTALLVPLALGLGLALACLGLL LAVVSLGSRASLSAQEPAQEELVAEEDQDPSELNPQTEE SQDPAPFLNRLVRPRRSAPKGRKTRARRAIAAHYEVHPR PGQDGAQAGVDGTVSGWEEARINSSSPLRYNRQIGEFIV TRAGLYYLYCQVHFDEGKAVYLKLDLLVDGVLALRCL EEFSATAASSLGPQLRLCQVSGLLALRPGSSLRIRTLPWA HLKAAPFLTYFGLFQVH
189	TWEAK мыши	MASAWPRSLPQILVLGFGLVLMRAAAGEQAPGTSPCSS GSSWSADLDKCMDCASCPARPHSDFCLGCAAAPPAHFR LLWPILGGALSLVLVLALVSSFLVWRRRCRRREKFTTPIEE TGGEGCPGVALIQ

190	TRANCE человека	MRRASRDYTKYLRGSEEMGGGPGAPHEGPLHAPPPAP HQPAAASRSMFVALLGLGLGQVVCSVALFFYFRAQMDP NRISEDGTHCIYRILRLHENADFQDTTLESQDTKLIPDSCR RIKQAFQGA VQKELQHIVGSQHIRAEKAMVDGSWDLA KRSKLEAQPFAHLTINATDIPSGSHK VSLSSWYHDRGWA KISNMTFSNGKLIVNQDGFYYLYANICFRHHETSGDLAT EYLQLMVYVTKTSIKIPSSHTLMKGGSTKYWSGNSEFHF YSINVGGF FKLRS GEEISIEVSNPSLLDPDQDATYFGAFK VRDID
191	TRANCE мышцы	MRRASRDYGKYLRSSSEEMGSGPGVPHEGPLHPAPSAPA PAPPPAASRSMFLALLGLGLGQVVCSIALFLYFRAQMDP NRISEDSTHCFYRILRLHENADLQDSTLESED TLPDSCRR MKQAFQGA VQKELQHIVGPQRFS GAPAMMEGSWLDVA QRGKPEAQPFAHLTINAASIPSGSHK VTLSSWYHDRGWA KISNMTLSNGKLRVNQDGFYYLYANICFRHHETSGSVPT DYLQLMVYVVKTSIKIPSSHNL MKGGSTKNWSGNSEFH FYSINVGGF FKL RAGEEISIQVSNPSLLDPDQDATYFGAF KVQDID
192	TGF-beta 1 человека	MPPSGLRLLLLLLPLLWLLVLT PGRPAAGLSTCKTIDME LVKRKRIE AIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLAL YNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHN EIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLL RLKLVQHVELYQKYSNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWL SFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQV DINGFTTGRRGDLATIHG MNRPFLLLMATPLERAQHLQS SRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWI HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP ASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCK CS
193	TGF-бета 1 мышцы	MPPSGLRLLPLLPLPWLLVLT PGRPAAGLSTCKTIDMEL VKRKRIE AIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLAL YNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDRNN AIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRQR LKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRLTPTDTPPEWLS

		FDVTGVVRQWLNQGDGIQGFSAHCSCDSKDNKLHVE INGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSR HRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE PKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPAS ASPCCVPALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS
194	TGF-бета 2 человека	MHYCVLSAFLILHLVTVALSLSTCSTLDMDQFMRKRIEA IRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEK ASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPT FYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKEAR VPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLS FDVTDVAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYII PNKSEELERFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTP HLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDNC CLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWS SDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGK TPKIEQLSNMIVKSKCS
195	TGF-бета 2 мыши	MHYCVLSTFLLLHLVPVALSLSTCSTLDMDQFMRKRIEA IRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEK ASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPSHLPSENAIPP TFYRPFYFRIVRFDVSTMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKEA RVAEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEW LSFDVTDVAVQEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNY IIPNKSEELERFAGIDGTSTYASGDQKTIKSTRKKTSKGT PHLLMLLPSYRLESQQSSRRKKRALDAAYCFRNVQDN CCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLW SSDTQHTKVLVSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIG NTPKIEQLSNMIVKSKCS
196	TGF-бета 3 человека	MKMHLQRALVVLALLNFATVSLSLSTCTTLDFGHIKKK RVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRE LLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEH NELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRV PNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRG AEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPN GDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDH

		HNPHLILMMIPPHRLDNPQGQGRKKRALDTNYCFRNL EENCVRPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYANFCSGPCP YLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVQDLEPLTIL YYVGRTPKVEQLSNMVVKSCCKCS
197	TGF-бета 3 мышцы	MHLQRALVVLALLNLATISLSLSTCTTLDFGHIKKRVE AIRGQILSKLRLTSPPEPSVMTHVPYQVLALYNSTRELLE EMHGEREEGCTQETSESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNEL AVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNGTNLFRAEFRVLRVNP SSKRTEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEW LSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDIL ENVHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHP HLILMMIPPHRLDSPGQGSQRKKRALDTNYCFRNLEENC CVRPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYANFCSGPCPYLRS ADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVQDLEPLTILYYV GRTPKVEQLSNMVVKSCCKCS
198	ЕРО человека	MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVL ERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAW KRMEVGQQAWEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPW EPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASA APLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDR
199	ЕРО мышцы	MGVPERPTLLLLSLLIPLGLPVLCAAPPRLICDSRVLERY ILEAKEAENVMTGCAEGPRLSENITVPDTKVNFYAWKR MEVEEQAIQVWQGLSLLSEAILQAQALLANSSQPPELQ LHIDKAISGLRSLTSLLRVLGAQKELMSPPDTPPAPLRT LTVDTFCKLFRVYANFLRGKLLKLYTGEVCRRGDR
200	ТРО человека	MELTELLVVMLLLARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRD SHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEE TKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSG QVRLLLGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHL LRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPSRTSLVTLNE LPNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLL NQTSRSLDQIPGYLNRIHELLNGTRGLFPGPSRRTL ISSGTSDTGSLPPNLQPGYSPSPHTPPTGQYTLFPLPPTLPT PVVQLHPLLDPSPAPTPTPSPLLNTSYTHSQNLSQEG

201	ТРО мышцы	MELTDLLLAAMLLAVARLTLSSPVAPACDPRLLNKLLR DSHLLHSRLSQCPDVDPLSIPVLLPAVDFSLGEWKTQTE QSKAQDILGAVSLLLEGVMAARGQLEPSCSSLLGQLSG QVRLLLGALQGLLGTQLPLQGRTTAHKDPNALFLSLQQ LLRGKVRFLLVEGPTLCVRRTLPTTAVPSSTSQLLTLNK FPNRTSGLLETNFSVTARTAGPGLLSRLQGFRVKITPGQL NQTSRSPVQISGYLNRTHGPNVNGTHGLFAGTSLQTLEAS DISPGAFNKGSALFNLQGGPPSPSLAPDGHTPFPPSPALP TTHGSPPQLHPLFPDPSTTMPNSTAPHPVTMYPHPRNLSQ ET
202	FLT-3L человека	MTVLAPAWSPTTYLLLLLLLLSSGLSGTQDCSFQHSPSSD FAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVL AQRWMERLKTVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKCAFQPP PSCLRFVQTNISRLQETSEQLVALKPWITRQNFSCRLEL QCQPDSSTLPPPWSRPLEATAPTAPQPPLLLLLLLLPVGL LLLAAAWCLHWQRTRRRTPRPGEQVPPVPSQDLLLVE H
203	FLT-3L мышцы	MTVLAPAWSPNSSLLLLLLLLSPCLRGTPDCYFSSHPISS NFKVKFRELTDHLLKDYPVTVAVNQDEKHCKALWSLF LAQRWIEQLKTVAGSKMQTLLEDVNTEIHFVTSCTFQPL PECLRFVQTNISHLLKDTCTQLLALKPCIGKACQNFSCRCL EVQCQPDSSTLLPPRSPIALEATELPEPRPRQLLLLLLLLL PLTLVLLAAAWGLRWQRARRRGELHPGVPLPSHP
204	SCF человека	MKKTQTWILTCIYLQLLLFNPLVKTEGICRNRVTNNVKD VTKLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLP SHCWISEMVVQL SDSLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKE NSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVAS ETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVAASSLRNDSS SSNRKAKNPPGDSSLHWAAMALPALFSLIIGFAFGALYW KKRQPSLTRAVENIQINEEDNEISMLQEKEREFQEV
205	SCF мышцы	MKKTQTWIITCIYLQLLLFNPLVKTKEICGNPVTDNVKDI TKLVANLPNDYMITLNYVAGMDVLP SHCWLRDMVIQL SLSLTTLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLGKIVDDL VLCMEEN APKNIKESPKRPETRSFTPEEFFSIFNRSIDAFKDFMVASD

		TSDCVLSSTLGPEKDSRVSVTKPFMLPPVAASSLRNDSS SNRKAAPEDSGLQWTAMALPALISLVIGFAFGALYW KKKQSSLTRAVENIQINEEDNEISMLQQKEREFEV
206	М-CSF человека	MTAPGAAGRCPPTTWLGSLLLLVCLLASRSITEEVSEYC SHMIGSGHLQSLQRLIDSQMETSCQITFEFVDQEQLKDPV CYLKKAFLLVQDIMEDTMRFRDNTPNIAIIVQLQELSLR LKSCFTKDYEEDKACVRTFYETPLQLLEKVKNVFNET KNLLDKDWNIFSKNCNNSFAECSSQDVVTKPDCNCLYP KAIPSSDPASVSPHQPLAPSMAPVAGLTWEDSEGTEGSSL LPGEQPLHTVDPGSAKQRPPRSTCQSFEPPEPVPVKDSTI GGSPQPRPSVGAFNPGMEDILDSAMGTNWVPEEASGEA SEIPVPQGTELSPSRPGGSMQTEPARPSNFLSASSPLPAS AKGQQPADVTGTALPRVGPVRPTGQDWNHTPQKTDHP SALLRDPPEPGSPRISSLRPQGLSNPSTLSAQPLSRSHSS GSVLPLGELEGRRSTRDRRSPAEEGGPASEGAARPLPRF NSVPLTDTGHERQSEGSFSPQLQESVFHLLVPSVILVLLA VGGLLFYRWRRRSHQEPQRADSPLEQPEGSPLTQDDRQ VELPV
207	М-CSF мыши	MTARGAAGRCPSSTWLGSLLLLVCLLMSRSIAKEVSEHC SHMIGNGHLKVLQQLIDSQMETSCQIAFEFVDQEQLDDP VCYLKKAFFLVQDIIDETMRFKDNTPNANATERLQELSN NLNSCFTKDYEENKACVRTFHETPLQLLEKIKNFFNET KNLLEKDOWNIFTKNCNNSFAKCSSRDVVTKPDCNCLYP KATPSSDPASASPHQPPAPSMAPLAGLAWDDSQRTEGSS LLPSELPLRIEDPGSAKQRPPRSTCQTLESTEQPNHGDRL TEDSQPHPSAGGPVPGVEDILESSLGTNWVLEEASGEAS EGFLTQEAKFSPSTPVGGSQAETDRPRALSASPFKSTED QKPV DITDRPLTEVNPMRPIGQTQNNTPEKTDGTSTLRE DHQEPGSPHIATPNPQRVSNSATPVAQLLLPKSHSWGIVL PLGELEGKRSTRDRRSPAEEGGSAASEGAARPVARFNSIP LTDGTHVEQHEGSSDPQIPESVFHLLVPGIILVLLTVGGL LFYKWKWRSHRDPQTL DSSVGRPEDSSLTQDEDRQVEL PV

208	MSP человека	<p>MGWLPLLLLLTQCLGVPGQRSPLNDFQVLRGTELQHLL HAVVPGPWQEDVADAEECAGRCGPLMDCRAFHYNVSS HGCQLLPWTQHSPHTRLRRSGRCDLFQKKDYVRTCIMN NGVGYRGTMAITVGGGLPCQAWSHKFPNDHKYTPTLRN GLEENFCRNPDPGGPWCYTTPAVRFQSCGIKSCREA ACVWCNGEEYRGAVDRTEGREGQRWDLQHPHQHPFE PGKFLDQGLDDNYCRNPDGSERPWCYTTPQIEREFCDL PRCGSEAQPRQEATTVSCFRGKGEGYRGTANTTTAGVP CQRWDAQIPHQHRFTPEKYACKDLRENFCRNPDGSEAP WCFTLRPGMRAAFCYQIRRCTDDVVRPQDCYHGAGEQY RGTVSKTRKGVQCQRWSAETPHKQPFTFTSEPHAQLEE NFCRNPDGDSHGPPWCYTMDPRTPFDYCALRRCADDQPP SILDPPDQVQFEKCGKRVDRLDQRRSKLRVVGHPGNSP WTVSLRNRQGQHFCGGSLVKEQWILTARQCFSSCHMPL TGYEVWLGTLFQNPQHGEPSLQRPVAKMVCGPSGSQ VLLKLETSVTLNQRVALICLPPEWYVPPGTKCEIAGWG ETKGTGNDTVLNVALLNVISNQEENIKHRGRVRESEMC TEGLLAPVGACEGDYGGPLACFTHNCWVLEGIIPNRVC ARSRWPAVFTRVSVFVDWIHKVMRLG</p>
209	MSP мышцы	<p>MGLPLPLLQSSLLMLLLRLSAASTNLNWQCPRIPIYAAS RDFSVKYVVPSPFSAGGRVQATAAYEDSTNSAVFVATRN HLHVLGPDQLFIENLTTGPIGNPGCQTCASCGPDPHGGPK DTDTLVLMPEGLPALVSCGSTLQGRCLHELEPRGKAL HLAAPACLFSANNNKPEACTDCVASPLGTRVTVVEQGH ASYFYVASSLDPELAASFSPRSVSIRRLKSDTSGFQPGFPS LSVLPKYLASYLIKVYVSFHSDFVYFLTVQPISVTSPPS ALHTRLVRLNAVEPEIGDYRELVLDFHAPKRRRRGAPPE GTQYPYVLQAAHSAPVDAKLAVELISEGQEVLFVGFVT VKDGGSGMGPNSVVCAPFIYHLNIIIEGVEYCCHSSNSS SLLSRGLDFFQTPSFCPNPPGGEASGPSSRCHYFPLMVHA SFTRVDLFNLLGSVKVTALHVTRLGNVTVAHMGTVD GRVLQVEIARSLNYLLYVSNFSLGSSGQPVHRDVSRLGN DLLFASGDQVFKVPIQGGPCRHFLTCWRCLRAQRFMGC GWCGRCDRQKECPGSWQQDHCPEISEFYPHSGPLRG</p>

		TTRLTLCGSNFYLRPDDVVPEGTHQITVGGQSPCRLLPKDS SSPRPGSLKEFIQELECELEPLVTQAVGTTNISLVITNMPA GKHFRVEGISVQEGFSFVEPVLTSIKPDFGPRAGGTYLTL EGQSLSVGTSTRAVLVNGTQCRLEQVNEEQILCVTPPGAG TARVPLHLQIGGAEVPGSWTFHYKEDPIVLDISPKCGYS GSHIMIHGQHLTSAWHFTLSFHDGQSTVESRCAGQFVEQ QQRRCRLPEYVVRNPQGWATGNLSVWGDGAAGFTLPG FRFLPPSPLRAGLVELKPEEHSVKVEYVGLGAVADCVT VNMTVGGGEVCQHELKRGDVICPLPSSLQLGKDGVPVPLQV CVDGGCHILSQVVRSSPGRASQRILLIALLVLILLVAVLA VALIFNSRRRKKQLGAHSLSPPTLSDINDTASGAPNHEES SESRDGTSPVLLRTEIRLQDLDRMLLAEVKDVLPHEQV VIHTDQVIGKGFHGVVYHGEYTDGAQNQTHCAIKSLRI TEVQVEEAFREGLLMRGLHHPNILALIGIMLPPEGLPRV LLPYMRHGDLHFIRSPQRNPTVKDLVSFGLQVACGME YLAEQKFVHRDLAARNCMLDESFTVKVADEFLARGVL DKEYYSVRQHRHARLPVKWMALESQTYRFTTKSDVW SFGVLLWELLTRGAPPYPHIDPFDLSHFLAQGRRLPQPEY CPDSLYHVMLRCWEADPAARPTFRALVLEVKQVVASLL GDHYVQLTAAAYVNVGPRAVDDGSPPEQVQPSQHCRS TSKPRPLSEPPLPT
210	Линкер	GSSGGSGGSGG
211	Линкер	GGGSGGGS
212	Линкер	GGGSGGGSGGGS
213	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS
214	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
215	Линкер	GGGGSGGGGS
216	Линкер	(GGGGS)n
217	Линкер	GGGGSGS
218	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGS
219	Линкер	GGSLDPKGGGGS
220	Линкер	PKSCDKTHTCPPCPAPELLG
221	Линкер	SKYGPPCPPCPAPEFLG

222	Линкер	GKSSGSGSESKS
223	Линкер	GSTSGSGKSSEGGK
224	Линкер	GSTSGSGKSSEGGSTKG
225	Линкер	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
226	Линкер	GSTSGSGKPGSSEGST
227	Линкер	(GSGGS) _n
228	Линкер	(GGGS) _n
229	Линкер	GGSG
230	Линкер	GGSGG
231	Линкер	GSGSG
232	Линкер	GSGGG
233	Линкер	GGGSG
234	Линкер	GSSSG
245	Линкер	GPQGTAQ
250	Линкер	YGAGLGW
264	CM	AQNLLGMY
265	CM	LSGRSDNHGGAVGLLAPP
266	CM	VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH
267	CM	LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP
268	CM	LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS
269	CM	ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH
270	CM	LSGRSDNHGGSGGSQNQALRMA
271	CM	QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH
272	CM	LSGRSGNHGGSGGSQNQALRMA
273	CM	QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH
274	CM	ISSGLLSGRSGNH
275	CM	AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG
276	CM	TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP
277	CM	VHMPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG
278	CM	TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP
279	CM	LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS

280	Расщепляемая последовательность	PRFKIIGG
281	Расщепляемая последовательность	PRFRIIGG
282	Расщепляемая последовательность	SSRHRRALD
283	Расщепляемая последовательность	RKSSIIIRMRDVVL
284	Расщепляемая последовательность	SSSFDKGGKYKKGDDA
285	Расщепляемая последовательность	SSSFDKGGKYKRGDDA
286	Расщепляемая последовательность	IEGR
287	Расщепляемая последовательность	IDGR
288	Расщепляемая последовательность	GGSIDGR
289	Расщепляемая последовательность	PLGLWA
290	Расщепляемая последовательность	GPQGIAGQ

291	Расщепляемая последовательность	GPQGLLGA
292	Расщепляемая последовательность	GIAGQ
293	Расщепляемая последовательность	GPLGIAGI
294	Расщепляемая последовательность	GPEGLRVG
295	Расщепляемая последовательность	YGAGLGVV
296	Расщепляемая последовательность	AGLGVVER
297	Расщепляемая последовательность	AGLGISST
298	Расщепляемая последовательность	EPQALAMS
299	Расщепляемая последовательность	QALAMSAI
300	Расщепляемая последовательность	AAVHLVSQ
301	Расщепляемая последовательность	MDAFLESS

302	Расщепляемая последовательность	ESLPVVAV
303	Расщепляемая последовательность	SAPAVESE
304	Расщепляемая последовательность	DVAQFVLT
305	Расщепляемая последовательность	VAQFVLT
306	Расщепляемая последовательность	VAQFVLTE
307	Расщепляемая последовательность	AQFVLTEG
308	Расщепляемая последовательность	PVQPIGPQ
309	IFN- α 2b-1204dL-hIgG4, с сигнальной последовательностью	<i>METDTLLLWVLLWVPGSTGCDLPQTHSLGSRRTLMLLA QMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEA CVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYS PCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGRSDNIGGGS ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTV DKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLS</i>
310	IFN- α -1204dL-hIgG4	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTT TGTGGGTGCCAGGATCCACAGGCTGTGATCTGCCTCA

	(полинуклеотид)	AACGCATTCATTGGGGTCCAGGCGCACGCTTATGTTG CTTGACAGATGAGGAGAATATCACTTTTCTCTTGCTT GAAGGACCGCCACGATTTTGGCTTTCGCGAGGAAGAG TTCGGTAACCAGTTCCAAAAGGCAGAGACAATCCCCG TTTTGCATGAGATGATCCAACAGATCTTTAACCTGTTT TCAACCAAGGATAGCAGCGCAGCGTGGGATGAGACA CTGCTTGACAAGTTTTACACCGAGCTCTATCAGCAACT TAATGATCTCGAAGCCTGCGTAATCAAGGAGTAGGC GTTACAGAGACACCTTTGATGAAGGAGGATTCCATCC TTGCAGTAAGAAAATACTTCCAGAGGATCACCTCTA CCTCAAAGAAAAGAAATACTCCCCATGCGCGTGGGAA GTAGTGCGAGCTGAAATAATGCGGAGCTTTTCTTTGTC AACTAATCTCCAAGAATCTCTGAGAAGCAAGGAGTCA GGTAGGTCTGATAATATCGGGGGAGGTTCTGAATCTA AGTACGGCCCTCCTTGTCCTCCATGTCTGCTCCAGAG TTTCTCGGAGGCCCTCCGTGTTCTGTTTCTCCAAA GCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCTGAA GTGACCTGCGTGGTGGTTCGACGTTTACAAGAGGACC CCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA AGTGACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACA GTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCAT CGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAG GGAACCCAGGTTTACACACTGCCACCTAGCCAAGAG GAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGG TCAAGGGCTTTTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATG GGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGAC CACACCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCC TGTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGC AGCAGGGCAACGTGTTTACGCTGCAGCGTGATGCACGA GGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGC CTGAGCTGA
--	-----------------	---

311	IFN- α 2b-1490DNI-hIgG4, с сигнальной последовательностью	<p><i>METDTLLLWVLLLWVPGSTGCDLPQTHSLGSRRTLMLLA</i> <i>QMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAETIPVLHE</i> <i>MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKfyTELYQQLNDLEA</i> <i>CVIQGVGVTEtPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYS</i> <i>PCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSD</i> <i>NIGGGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI</i> <i>SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK</i> <i>PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL</i> <i>PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL</i> <i>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY</i> <i>SRLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLS</i></p>
312	IFN- α 2b-1490DNI-hIgG4 (полинуклеотид)	<p><i>ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTT</i> <i>TGTGGGTGCCAGGATCCACAGGCTGTGATCTGCCTCA</i> <i>AACGCATTCATTGGGGTCCAGGCGCACGCTTATGTTG</i> <i>CTTGACACAGATGAGGAGAATATCACTTTTCTCTTGCTT</i> <i>GAAGGACCGCCACGATTTTGGCTTCCGCAGGAAGAG</i> <i>TTCGGTAACCAGTTCCAAAAGGCAGAGACAATCCCCG</i> <i>TTTTGCATGAGATGATCCAACAGATCTTTAACCTGTTT</i> <i>TCAACCAAGGATAGCAGCGCAGCGTGGGATGAGACA</i> <i>CTGCTTGACAAGTTTTACACCGAGCTCTATCAGCAACT</i> <i>TAATGATCTCGAAGCCTGCGTAATTCAAGGAGTAGGC</i> <i>GTTACAGAGACACCTTTGATGAAGGAGGATTCCATCC</i> <i>TTGCAGTAAGAAAATACTTCCAGAGGATCACCTCTA</i> <i>CCTCAAAGAAAAGAAATACTCCCCATGCGCGTGGGAA</i> <i>GTAGTGCGAGCTGAAATAATGCGGAGCTTTTCTTTGTC</i> <i>AACTAATCTCCAAGAATCTCTGAGAAGCAAGGAGATT</i> <i>AGTTCTGGCCTGCTGTCAGGTAGGTCTGATAATATCG</i> <i>GGGAGGTTCTGAATCTAAGTACGGCCCTCCTTGTCCT</i> <i>CCATGTCCTGCTCCAGAGTTTCTCGGAGGCCCTCCGT</i> <i>GTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGA</i> <i>TCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTTCGA</i> <i>CGTTTCACAAGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGG</i> <i>TACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC</i> <i>AAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGA</i></p>

		GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGC TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA AGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAA GGCCAAGGGCCAGCCAAGGGAACCCCAGGTTTACAC ACTGCCACCTAGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTACCCCT CCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCC TGAGAACA ACTACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGAC AGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAGACTGACCG TGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCTGA
316	ProC440	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKESGRSDNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL S
318	Fc IgG человека с мутацией по типу «выступ»	CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
319	Fc IgG человека с мутацией по типу «впадина»	CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE

		WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSRITVVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSLG
320	фрагмент в виде «заглушки»	SDNI
321	ProC732	QSGQTDVDYYREWSWTQVSGSSGGSLSGRSDNIGSGGS CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILA VRKYFQRITL YLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKELSGRSDNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LS
322	ProC733	QSGQTDVDYYREWSWTQVSGSSGGSLSGRSDNIGSGGS CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILA VRKYFQRITL YLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRKEESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL S
323	Маскирующий IFNa-2b пептид	TDVDYYREWSWTQVS
324	Линкер	GSSGGS
325	Линкер	ESKY
326	ProC286	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF

		NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTV DKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSSGGGGS GRSDNIGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSC LKDRHDFGFPQEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFST KDSSAAWDETLDDKDFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTE TPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAE IMRSFSLSTNLQESLRSKE
327	Линкер	SGGG
328	Укороченный IFNa-2b (аминокислота 1– 150)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTEPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRS
329	Мутант IFNa-2b L130P	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTEPLMKEDSILA VRKYFQRITLYPKKYYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKE
от 331 до 479	Последовательнос ти PM	(См. таблицу 12 ниже для последовательностей)
480	Последовательнос ть ProC859	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFP QEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDE DLLDKFCTEL YQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNVDSI LAVKKYFRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLST NLQERLRKELSGRSDNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPVETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGS FFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSL SLS

481	Универсальная последовательность IFN-альфа A/D	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFTTKDSSAAWDE DLLDKFCTEL YQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNVDISI LAVKKYFRRITLYL TEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLST NLQERLRRKE
482	Бета-интерферон, А-цепь, человеческий (1AU1)	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMN FDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIF RQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKE DFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSH CAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYL RN
483	IFNB_CHICK Q90873.1	MTANHQSPGMHSILLLLLLL PALTTTFSCNHLRHQDANFS WKSLLQNTAPPPPQPCPQQDVTFFPETL LKSKDKKQAAITTLRILQH LFNMLSSPHTPKHWIDRTRH SLLNQIQHYIHHLEQCFVNQGTRSQR RGPRN AHL SINKYFRSIHNF LQHNNYSACTWDHVRLQARDCFR HVDTLIQWMKSRAPLTASSKRLNTQ
484	IFNA3_CANLF O97945.1	MALPCSFSVALVLLSCHSLCCLACHLPDTHSLRNWRVLT LLGQMRRLSASSCDHYTTDFAFPKE LFDGQR LQEAQALSVVHVMTQKVFHLFCTNTSSAPWNMTLLEEL CSGLSEQLDDLDACPLQEAGLAETPLMHEDST LRTYFQRISLYLQDRNHSPCAWEMVRAEIGRSFFSLTILQ ERVRRRK
485	IFN_ANAPL P51526.1	MPGPSAPPPPAIYSALALLLLTPPANAFSCSPLRLHDSAF AWDSLQLLRNMAPSPTQPCPQQHAPCSFP DTLLDTNDTQQAHTALHLLQH LFDLSSPSTPAHWLH TARHDLLNQLQHIIHHLERCFPADAARLHRRG PRNLHLSINKYFGCIQHFLQNHTYSPCAWDHVRLEAHAC FQRIHRLTRTMR
486	IFNAH_BOVIN P49878.1	MAPAWSFLLALLLSCNAICSLGCHLPHTHSLPNRRVLT LLRQLRRVSPSSCLQDRNDFAFPQEALGGSQ LQKAQAISVLHEVTQHTFQLFSTEGSAAAWDESLLDKLR AALDQQLTDLQACLRQEEGLRGAPLLKEDAS LAVRKYFHRLTYLREKRHNPCAWEVVRAEVMRAFSSS TNLQERFRRKD

487	IFNA1_CHICK P42165.1	MAVPASPQHPRGYGILLTLLKALATTASACNHLRPQD ATFSHDSLQLLRDMAPTLPQLCPQHNASCSF NDTILDTSNTRQADKTTHDILQHLFKILSSPSTPAHWNDS QRQSLLNRIHRYTQHLEQCLDSSDTRSRT WPRNLHLTIKKHFSCLHTFLQDNDYSACAWEHVRLQAR AWFLHIHNLGTNTRT
488	IFNA_FELCA P35849.1	MALPSSFLVALVALGCNSVCSLGCGLPQTHGLLNRRALT LLGQMRRLPASSCQKDRNDFAFPQDVFGGDQ SHKAQALSVVHVNTNQKIFHFFCTEASSAAWNTTLLEEF CTGLDRQLTRLEACVLQEVEEGEAPLTNEDI HPEDSILRNYFQRLSLYLQEKKYSPCAWEIVRAEIMRSLY YSSTALQKRLRSEK
489	интерферон-бета-1 [Sus scrofa] AAA31056.1	MANKCILQIALLMCFSTTALSMSYDVLRYQQRSSNLAC QKLLGQLPGTPQYCLEDRMNFEVPEEIMQPPQ FQKEDAVLIHEMLQQIFGILRRNFSSTGWNETVIKTILVE LDGQMDDLETILEEIMEEENFPRGDMTIL HLKYYLSILQYLKSKEYRSCAWTVVQVEILRNFSFLNR LTDYLRN
490	IFNB2_BOVIN P01576.1	MTHRCLLQMVLLLCFSTTALSRSYLLRFQQRSLALCQ KLLRQLPSTPQHCLARMDFQMPEEMKQAQQ FQKEDAILVIYEMLQQIFNILTRDFSSTGWSETIIEDLLEEL YEQMNHLEPIQKEIMQKQNSTMGDTTVL HLRKYYFNLVQYLKSKEYNRCAWTVVRVQILRNFSFLT RLTGYLRE
491	А-цепь, ИНТЕРФЕРОН- АЛЬФА 2В 1RH2	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTK DSSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTET PLMNEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVRRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
492	Линкер	SGGGG
493	ProC288	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVRAEIMRSFSLSTNL

		<p>QESLRKESGGGGSGRSDNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLS</p>
494	ProC289	<p>CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVRAEIMRSFSLSTNL QESLRKESGGGGSGRSDNIGPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLS</p>
495	ProC290	<p>CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVRAEIMRSFSLSTNL QESLRKESGGGGSGRSDNIESKYGPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLS</p>
496	ProC291	<p>CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVRAEIMRSFSLSTNL QESLRKESGGGGSGRSDNIGGGSESKYGPPCPAPEF</p>

		LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLS
497	ProC441	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKESGRSDNIGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN A
498	ProC442	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKESGRSDNIESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHY TQKSLSLS
499	ProC443	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKESGRSDNIGGSESKYGPPCPPCAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT

		TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLS
235	ProC1023	QSGQTDVDYYREWSWTQVSGSSGGSLSGRSDNIGSGGS CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFTTKDSSAAWDE DLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNVDSI LAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTN LQERLRRKELSGRSDNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LS
236	ProC1549	QSGQTDVDYYREWSWTQVSGSSGGSGGGSGGGSGGG SCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGF PQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFTTKDSSAAWDE DLLDKFCTEL YQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNVDSI LAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLST NLQERRRKEGGSGGGGSCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS SLS
237	ProC659 (нерасщепляемый стерически маскированный IFN-a2b)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEGGSGGGSCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL

		TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LS
238	Плечо 1 ProC1239	QSGQTDVDYYREWSWTQVSGSSGGSLSGRSDNIGSGGS CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILA VRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLSKELSGRSDNICPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK
239	Плечо 2 ProC1239	SDNICPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSLG
240	ProC1301	QSGQTDVDYYREWSWTQVSGSSGGSGGGSGGGSGGG SCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGF PQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDE TLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSIL AVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTN LQESRSKEGGSGGGGSCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LS
241	CM	GLSGRSDNHG

242	Сигнальная последовательность	MRAWIFLLCLAGRALA
243	Сигнальная последовательность	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG
244	Сигнальная последовательность	METDTLLLWVLLLVPGSTG
246	спейсер	QGQSGS
247	спейсер	GQSGS
248	спейсер	QSGS
249	спейсер	QGQSGQG
251	спейсер	GQSGQG
252	спейсер	QSGQG
253	спейсер	SGQG
254	спейсер	QGQSGQ
255	спейсер	GQSGQ
256	спейсер	QSGQ
257	спейсер	QGQSG
258	спейсер	QGQS
259	ProC1640	DNIGSGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTEPTP LMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIM RSFSLSTNLQESLRSKELSGRS
260	ProC1822	KNLKSPQKVEVDIIDDNFILRWNRSDSVGNVTFSDYQ KTGMDNWIKLSGCQNITSTKCNFSSLKLNVEEIKLRIRA EKENTSSWYEVDSTPFRKAQIGPPEVHLEAEDKAIVIH SPGTKDSVMWALDGLSFTYSLVIWKNSSGVEERIENIYS RHKIYKLPETTYCLKVKAALLTSWKIGVYSPVHCITTT VENELPPPENIEVSVQNQNYVLKWDYTYANMTFQVQW LHAFLKRNPNGNHLKYKWKQIPDCENVKTTQCVPQNVFQ

		<p>KGIYLLRVQASDGNNTSFWSEEIKFDTEIQAFLLPPVFNIR SLSDSFHIYIGAPKQSGNTPVIQDYPLIYEIIFWENTSNAE RKIIKKTDVTPNLKPLTVYCVKARAHTMDEKLNKSS VFSDAVCEKTKPGNTSKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG</p>
261	ProC1823	<p>ISYDSPDYTDESCTFKISLRNFRSILSWELKNHSIVPTHYT LLYTIMSKPEDLKVVKNCANTTRSFCDLTDEWRSTHEA YVTVLEGFSGNTTLFSCSHNFWLAIDMSFEPPEFEIVGFT NHINVMVKFPSIVEEELQFDLSLVIEEQSEGIVKKHKPEIK GNMSGNFTYIIDKLIPNTNYCVSVYLEHSDEQAVIKSPLK CTLLPPGQESESAESAEPKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG</p>
262	ProC1824	<p>KNLKSPQKVEVDVIDDNFILRWNRSEESVGNVTFSDYQ KPEMDNWIKLPGCQNMTSTKCNFSSLKLNIEIKLRIR AEKENTSSWCEVDSFTPFRKAQIGPPEVHLEADKAIVY ISPPGTEDSVMWALDRSSFTYSLVIWKNSSSVEERIENIYS RHKISKLSPETTYCLKVKAALLTSRKIGVYGPVHCIKTTV ENELPPPENIEVIVQNQNYVLKWDYTYANMTFQVQWLH AFLKRKPGNHLKWKQIPDCENVTTTQCVPFPNTFQKGI YLLRVQASDGNNTSFWSEEIKFDTEIQASLLPPVFNIRSL DSLHISIGAPKWSENKPVQDYPLIYEILFWENTSKAERKI IKKKTDVTIPNLKPLTVYCVKARAHSMDEKLNKSSVFSD VVCEETKSGNTSKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG</p>

		VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYK TTP PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
263	ProC1825	ISHDLDPDYTSECTFKISLRNFRSILSWELKNHSIVATHYK LLYTIMSKPEDLKIVKNCANTTRSFCDLTDEWRSTHEAY VTSLEGFSGNTTLFNCSHNFWLDIDMSFEPPEFEIVGFTN HINVIVKFPSIVEEELQFDLSLVIEEQSEGIVK KHKPTIKG NMSGNFTYIIDKLIPNTNYCVSVYFDHNDEQAVIKSPLKC TLLQPGQESESAESA KPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTT PPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
313	ProC1718	ISYDSPDYTDESCTFKISLRNFRSILSWELKNHSIVPTHYT LLYTIMSKPEDLVVKNCA NTRSFCDLTDEWRSTHEA YVTVLEGFSGNTTLFSCSHNFWL AIDMSFEPPEFEIVGFT NHINVMVKFPSIVEEELQFDLSLVIEEQSEGIVK KHKPEIK GNMSGNFTYIIDKLIPNTNYCVSVYLEHSDEQAVIKSPLK CTLLPPGQESESAESA KGGGGSHHHHHHHH
314	ProC1976	DNIGSGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETL LDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETP LMKEDSILAVRK YFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIM RSFSLSTNLQESLRSKELSGRS

Таблица 12. Примеры маскирующих пептидов (PM), связанных с соответствующими цитокинами

Цитокин, который может быть связан с PM	Последовательность PM	SEQ ID NO:
---	-----------------------	------------

IFN	IAYLEYEHLHMAYG	331
IFN	TDVDYYREWCWTQVS	332
IFN	FPLNTFDLVHELLSR	333
IFN	FLNDIHRFLHWTDLM	334
IFN	PYTFVEQVEYWLHAT	335
IFN	ACVIHFLDRISNILE	336
IFN	FCYIAAFSAMQRQSC	337
IFN	PLYLPEIGWMFGLPT	338
IFN	TVLVIPDLHYLYVDR	339
IFN	FINNVETALDTIYNL	340
IFN	SAKHLHPGRLPPMTK	341
IFN	ATMYAYLERLEAILS	342
IFN	IYPLDALLRHLNSLC	343
IFN	CFPTVVWRELYNLYG	344
IFN	NLDFYLNHLYNLAG	345
IFN	DFINSMRSHLQSSDQ	346
IFN	EPKCSFCSPLIVPSP	347
IFN	PNCIESFLSSIHDSL	348
IFN	TDNALFLETVQHLYL	349
IFN	CYPSISWLFADAPRN	350
IFN	ELTQLLNALVDVRNC	351
IFN	LLSSFVETMSSILTC	352
IFN	YLLRLPSLEELWGPS	353
IFN	ATCYIINHWWVERYII	354
IFN	IAYLEYEHLHMAY	355
IFN	RVTCDDYYYGFGCNKFRPA	356
IFN	MLAVVGAAALVLVAGAPWVLPSAAGGENLKPPENIDV YIIDDNYTLKWSSHGESMGSVTFSAEYRTKDEAKWLKV PECQHNTTTKCEFSLLDTNVYIKTQFRVRAEEGNSTSSW NEVDPFIPFYTAHMSPEVRLEAEDKAILVHISPPGQDGN MWALEKPSFSYTIRIWQKSSSDKKTINSTYYVEKIPPELLP ETTYCLEVKAIHPSLKKHSNYSTVQCISTTVANKMPVPG NLQVDAQGKSYVLKWDYIASADVLFRAQWLPGYSKSSS	357

	GSRSDKWKPIPTCANVQTTHCVFSQDTVYTGTFFLHVQA SEGNHTSFWSEEKFIDSQKHILPPPPVITVTAMSDTLLVY VNCQDSTCDGLNYEIIFWENTSNTKISMEKDGPEFTLKN LQPLTVYCVQARVLFRRALLNKTSNFSEKLCEKTRPGSFS T	
IFN	MLLSQNAFIFRSLNLVLMVYISLVFGISYDSPDYTDESC FKISLRNFRSILSWELKNHSIVPTHYTLTYTIMSKPEDLKV VKNCANTTRSFCDLTDEWRSTHEAYVTVLEGFSGNTTLF SCSHNFWLAIDMSFEPPEFEIVGFTNHINVMVKFPSIVEEE LQFDLSLVIEEQSEGIVKKHKPEIKGNMSGNFTYIIDKLIP NTNYCVSVYLEHSDEQAVIKSPLKCTLLPPGQESESAESA K	358
IFN	MMVVLLGATTLVLVAVAPWVLSAAAGGKNLKSQKVE VDIIDDNFILRWNRSDSVGNVTFSDYQKTGMDNWIKL SGCQNTSTKCNFSSLKLVYEEIKLRIRAEKENTSSWYE VDSFTPFRKAQIGPPEVHLEAEDKAIVIHISPGTKDSVMW ALDGLSFTYSLVIWKNSSGVEERIENIYSRHKIYKLSPETT YCLKVKAALLTSWKIGVYSPVHCIKTTVENELPPPENIEV SVQNQNYVLKWDYTYANMTFQVQWLHAFKRNPGNH LYKWKQIPDCENVKTTQCVPQNVFQKGIYLLRVQASD GNNTSFWSEEIKFDTEIQAFLLPPVFNIRSLSDSFHIYIGAP KQSGNTPVIQDYPLIYEIIFWENTSNAERKIIIEKKTDTVTP NLKPLTVYCVKARAHTMDEKLNKSSVFSDAVCEKTKPG NTSK	359
IFN	MRSRCTVSAVGLLSLCLVVSASLETITPSAFDGYDPDEPCT INITIRNSRLILSWELNKSGPPANYTLWYTVMSKDENT KVKNCSDTTKSSCDVTDKWLEGMESYVVAIVIVHRGDL TVCRCSDYIVPANAPLEPPEFEIVGFTDHINVTMEFPPVTS KIIQEKMKTTPFVIKEQIGDSVRKKHEPKVNNVTGNFTFV LRDLLPKTNYCVSLYFDDDDPAIKSPLKCIVLQPGQESGLS ESA	360
IFN- α	TDVDYYREWXXXXXXXXX (X может быть любой аминокислотой)	361

IFN- α и IFN- β	GSGTDVDYYREWSWTQV	362
IFN- α и IFN- β	GSGTDVDYYREWSWTQVS	363
IFN- α и IFN- β	TDVDYYREWSWTQV	364
IFN- α и IFN- β	TDVDYYREWSWTQVS	323
IFN- γ	ALTSTEDPEPPSVPVPTNVLIKSYNLNPVVCWEYQNMSQ TPIFTVQVKVYSGSWTDSCTNISDHCCNIYEQIMYPDVSA WARVKAKVGQKESDYARSKEFLMCLKGKVGPPGLEIRR KKEEQLSVLVFHPEVVVNGESQGTMTFGDGSTCYTFDYT VYVEHNRSGEILHTKHTVEKEECNETLCELNISVSTLDSR YCLSVDGISSFWQVRTEKSKDVCIPPFHDDRKDS	366
IFN- γ	ASSPDSFSQLAAPLNPRLLHLYNDEQILTWEPSPSSNDPRP VVYQVEYSFIDGSWHRLLEPNCTDITETKCDLTGGGRLK LFPHPFTVFLRVRAKRGNLTSKWVGLEPFQHYENVTVGP PKNISVTPGKGS�VIHFSPPFDVFHGATFQYL VHYWEKSE TQQEQVEGPFKSNSIVLGNLKPVRVYCLQTEAQLILKNK KIRPHGLLSNVSCHETTANASARLQQVILPLGIFALLGL TGACFTLFLKYQSRVKYWFQAPPNIPEQIEEYLKDPDQFI LEVLDKDGSPKEDSWDSVSISSPEKERDDVLQTP	367
IFN- γ	EMGTADLGPSSVPTPTNVTIESYNMNPVYWEYQIMPQV PVFTVEVKNYGVKNSEWIDACINISHHVCNISDHVGDPS NSLWVRVKARVGQKESAYAKSEFAVCRDGKIGPPKLD IRKEEKQIMIDIFHPSVFVNGDEQEVDPETTCYIRVYN VYVRMNGSEIQYKILTQKEDDCDEIQCQLAIPVSSLNSQY CVSAEGLHVWGVTTTEKSKEVCITIFNSSIKG	368
IFN- γ	SQLPAPQHPKIRLYNAEQVLSWEPVALSNSTRPVVYQVQ FKYTDSKWFTADIMSIGVNCTQITATECDFTAASPSAGFP MDFNVTLRLRAELGALHSAWVTMPWFQHYRNVTVGPP ENIEVTPGEGSLIIRFSSPFDIADTSTAFFCYVHYWEKGG IQQVKGPFRSNSISLDNLKPSRVYCLQVQAQLLWNKSNIF RVGHLSNISCYETMADASTELQQ	369

IL-12	<p>CRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECS WQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRLQFSD QAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVK YEPPLGDIK VSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRT PSSPWKLGDCGPQDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQ LGSQGSSWSKWSSPVCVPPENPPQPQVRFSVEQLGQDGR RRLTLKEQPTQLELPEGCQGLAPGTEVTYRLQLHMLSCP CKAKATRTLHLGKMPYLSGAAYNVAVISSNQFGPLNQ TWHIPADTHTEPVALNISVGTNGTTMYWPARAQSMTYC IEWQPVGQDGGLATCSLTAPQDPDPAGMATYSWSRESG AMGQEKCYITIFASAHPEKLTWSTVLSTYHFGGNASA AGTPHHVSVKNHSLDSVSDWAPSLSTCPGVLKEYVV RCRDEDSKQVSEHPVQPTETQVTL SGLRAGVAYTVQVR ADTAWLRGVWSQPQRFSIEVQVSDWLIFASLGSFLSILL VGVLGYLGLNRAARHLCPPLPTPC AS S AIEFPGGKETW QWINP VDF QEEASLQEAL VVEMS WDKGERTEPLEKTELPEGAP ELALDTELSLEDGDRCKAKM</p>	370
IL-12	<p>KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGC FHYS RRNKLILYKFDRRINFHHGHSLSNSQVTGLPLGTTLFVCKL ACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVAC TWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNL TWQKQCKDIYCDYL DFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIV RPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRP SNSRLWNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEFQISSKLH LYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPTGMLDVWYMKRHIDY SRQQISLFWKNLSVSEARGKILHYQVTLQELTGGKAMTQ NITGHTSWTTVIPRTGNWAVAVSAANSKGSSLPTRINIM NLCEAGLLAPRQVSANSEGMDNILVTWQPPRKDPSAVQ EYVVEWRELHPGGDTQVPLNWLR SRPYNVSALISENIKS YICYEIRVYALSGDQGGCSSILGNSKHKAPLSGPHINAITE EKGSILISWNSIPVQEQMGCLLHYRIYWKERDSNSQPQL CEIPYRVSQNSHPINSLQPRVTYVLWMTALTAAGESSHG NEREFCLQGKANWMAFVAPSICIAIIMVGIFSTHYFQQKV</p>	371

	FVLLAALRPQWCSREIPDPANSTCAKKYPIAEEKTQLPLD RLLIDWPTPEDPEPLVISEVLHQVTPVFRHPPCSNWPQRE KGIQGHQASEKDMMHSAASSPPPPRALQAESRQLVDLYK VLESRGSDPKPENPACPWTVLPAGDLPTHGDLPSNIDD LPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKL TLDQLKMRCDSLML	
IL-12	NIDVCKLGTVTVQPAPVIPLGSAANISCSLNPQGC SHYP SSNELILLKFVNDVLVENLHGKKVHDHTGHSSTFQVTNL SLGMTLFFVCKLNCSNSQKKPPVPVCGVEISVGV APEPPQ NISCVQEGENGTVACSWNSGKVTYLKTNYTLQLSGPNN LTCQKQCFSDNRQNCNRLDLGINLSPDLAESRFIVRVTAI NDLGNSSSLPHTFTFLDIVIPLPPWDIRINFLNASGSRGTL QWEDEGQVVLNQLRYQPLNSTSWNMVNATNAKGKYD LRDLRPFTEYEFQISSKLHLSGGSSWSNWSESLRTRTPEEE PVGILDIWYMKQDIDYDRQQISLFWKSLNPSEARGKILH YQVTLQEVTKKTTLQNTTRHTSWTRVIPRTGAWTASVS AANSKGASAPTHINIVDLCGTGLLAPHQVSAKSENMDNI LVTWQPPKKADSAVREYIVEWRALQPGSITKFPPhWLRI PPDNMSALISENIKPYICYEIRVHALSESQGGC SSIRGDSK HKAPVSGPHITAITEKKERLFI SWTHIPFPEQRGCILHYRI YWKERDSTAQPELCEIQYRRSQNSHPISLQPRVTYVLW MTAVTAAGESPQGNEREFCPQ GKANWKAFVISSICIAIT VGTF SIRYFRQKAFTLLSTLKPQWYSRTIPDPANSTWVK KYPILEEKIQLPTDNLLMAWPTPEEPEPLIHEVL YHMIPV VRQPY YFKRGQGFQGYSTSKQDAMYIANPQATGTLTAE TRQLVNLYK VLES RDPDSKLANLTSPLT VTPVNYLPSHE GYLPSNIEDLSPHEADPTDSFDLEHQHISLSIFASSSLRPLI FGGERLTLDR LKMGYDSLMSNEA	372
IL-12	QLGASGPGDGCCVEKTSFPEGASGSPLGPRNLSCYRVSK TDYEC SWQYDGPEDNVSHVLWCCFVPPNHTHTGQERC RYFSSGPDRTVQFWEQDGIPVLSKVNFVVESRLGNRTM KSQKISQYLYNWKTPPLGHIKVSQSHRQLRMDWNVS EEAGAEVQFRRRMPTTNWTLGDCGPQVNSGSGVLGDIR	373

	GSMSESCLCPSENMAQEIQIRRRRLSSGAPGGPWS DWSMPVPCVPPEVLPQALVPRGS	
IL-12	QLGASGPGDGCCVEKTSFPEGASGSPLGPRNLSCYR VSKTDYECWQYDGPEDNVSHVLWCCFVPPNHTHTG QERC RYFSSGPDRTVQFWEQDGIPVLSKVNF WVESRLGNRTMKSQKISQYLYNWTKTTPPLGHIK VSQSHRQLRMDWNVSEAGAEVQFRRRMPTTNWTL GDCGPQVNSGSGVLDIR GSMSESCLCPSENMA QEIQIRRRRLSSGAPGGPWS DWSMPVPCVPPE VLPQAKIKFLVEPLNQGRRRLTMQGQSPQL AVPEGCRGRPGAQVKKHLVLRMLSCRCQAQTSK TVPLGKKLNLSGATYDLNVLAKTRFGRSTIQK WHLPAQELTE TRALNVSVGGNMTSMQWAAQAP GTTYCLEWQPWFQHRNHCTHCTLIVPEEEDPA KMTVTHSWSSKPTLEQEECYRIT VFASKNPKN PMLWATVLSYFYGGNASRAGTPRHVSVR NQT GDSVSVEWTASQLSTCPGVLTQYVVRCEAED GAW ESEWLVPPTKTQVTL DGLRSRVMYKVQ VRADTARLPGA WSHPQRFSEVQISRLSIIFAS LGSFASVLLVGS LGYIGLN RAAWHLCPPLPT PCGSTAVEFPGSQGKQAWQWCNPEDF PEVLY PRDALVVEMPGDRGDGTESPQA APECALDTR RP LETQRQRQVQALSEARRLGLAREDCPRGDL AHVTLPLLLGGVTQGASVLDLWRTHKTAEPGP PTLGQEA	374
IL-15	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDT SCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNL LILGAPDSQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRV MAIQDFKPFENLRLMAPISLQVV HVETHRCN ISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRV KPLQGEFTT WSPWSQPLAFRTKPAALGKDT	375
IL-15	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKR KAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDP ALVHQRPA	376
IL-15	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKR KAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDP	377
IL-15	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKR KAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR	378

IL-15	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTS SLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPST VTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPG SQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASA SHQPPGVYPQGHSDTT	379
IL-15	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTS SLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPST VTTAGVTPQPESLSPSGKEPAAS	380
IL-15	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTS SLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPST	381
IL-15	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVE HADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNK ATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQ PESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPS TGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQ GHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVLLACYLKSQRQTPPLASV EMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL	382
IL-2	AVKNCSHLECFYNSRANVSCMWSHEEALNVTTCVHA KSNLRHWNKTCELTLVRQASWACNLILGSFPESQSLTSV DLLDINVVCWEEKGWRRVKTCDHFDPDNRLVAPHSLQ VLHIDTQRCNISWKVSQVSHYIEPYLEFEARRRLLGHSW EDASVLSLKQRQQLFLEMLIPSTSYEVQVRVKAQRNN TGTW SPW SQPLTFRTRPADPMKE	383
IL-2	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMLAPISLQVV HVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICL ETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPA ALGKDT	384
IL-2	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMLAPISLQVV	385

	HVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEF QVRVKPLQ	
IL-2	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDF	386
IL-2	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLR LMAPISLQVV HVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTT WSPWSQPLAFRTKPAALGKD	387
IL-2	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLR LMAPISLQVV HVETHRSNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEA PLLTLKQKQEWISLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTW SPWSQPLAFRTKPAALGKD	388
IL-2	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLR LMAPISLQVV HVETHRSNISWEISQASHYFEDHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKWKQEWISLATLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTT WSPWSQPLAFRTKPAALGKD	389
IL-2	CGGHQYERRGGC	390
IL-2	CGGHYFERHG GC	391
IL-2	CQKLTTVDIC	392
IL-2	CSFHQYERHEGC	393
IL-2	CSGHQYERREGC	394
IL-2	CSGHYFERHEGC	395
IL-2	CSHYFERC	396

IL-2	DIVMTQSPLSLPVTGPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDW YLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKL ISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGTKVEIKR	397
IL-2	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTKVEIKR	398
IL-2	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCMQTSQFPTFGQGTKVEIKR	399
IL-2	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCMQTTQFPTFGQGTKVEIKR	400
IL-2	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCMQVTQFPTFGQGTKVEIKR	401
IL-2	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKR	402
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTILNCECKRGFRRIKSG SLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEE QKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKT RWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC TTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	403
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTILNCECKRGFRRIKSG SLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEE QKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKT RWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC	404
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTILNCECKRGFRRIKSG SLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEE QKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKT RWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKP	405

IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTILNCECKRGFRRISG SVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATE RIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK TRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCL VTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	406
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTILNCECKRGFRRISG SVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATE RIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK TRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC	407
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTILNCECKRGFRRISG SVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATE RIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK TRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKP	408
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKE LVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATE RIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK TRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCL VTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	409
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKE LVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATE RIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK TRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC	410
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKE LVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATE RIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK TRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKP	411
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRISG GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTS	412

IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIS GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGE	413
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIS GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC LVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	414
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIS GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC	415
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIS GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKP	416
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIS GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC LVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	417
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIS GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTG	418

IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIS GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICT	419
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIS GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC LVTTTDFQIQTEMAATMETS	420
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIS GSLYMLCTGSSSHSSWDNQCQCTSSATRSTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATE RIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK TRWTQPQLICTGE	421
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIS GSVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC LVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	422
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIS GSVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC	423
IL-2	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIS GSVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKP	424

IL-2	ELCLYDPPEIPHATFKAMAYKEGTILNCECKRGFRRIKSG SLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEE QKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKT RWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC TTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	425
IL-2	ELCLYDPPEIPHATFKAMAYKEGTILNCECKRGFRRIKSG SLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEE QKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKT RWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC	426
IL-2	ELCLYDPPEIPHATFKAMAYKEGTILNCECKRGFRRIKSG SVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATE RIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK TRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC VTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	427
IL-2	ELCLYDPPEIPHATFKAMAYKEGTILNCECKRGFRRIKSG SVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATE RIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK TRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC	428
IL-2	ELCLYDPPEIPHATFKAMAYKEGTILNCECKRGFRRIKSG SVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPE EQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATE RIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK TRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKP	429
IL-2	ELCLYDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKS GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC LVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	430

IL-2	ELCLYDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKS GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC	431
IL-2	ELCLYDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKS GSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKP	432
IL-2	ELCLYDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKS GSVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC LVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	433
IL-2	ELCLYDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKS GSVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSC	434
IL-2	ELCLYDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKS GSVYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT ERiyHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKP	435
IL-2	ELCLYDPPEVPNATFKALS YKNGTILNCECKRGFRRLKE LVYMRCLGNSWSSNCQCTS	436
IL-2	ELCLYDPPEVPNATFKALS YKNGTILNCECKRGFRRLKE LVYMRCLGNSWSSNCQCTSN SHDKSRKQVTAQLEHQK EQQT TDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRI YHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGW TQPQLTCVDEREHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTT DFPQPTETTAMTETFVLTMEYK	437

IL-2	ELCLYDPPEVPNATFKALS YKNGTILNCECKRGFRRLKE LVYMRCLGNSWSSNCQCTSN SHDKSRKQVTAQLEHQK EQQT TDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRI YHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGW TQPQLTCVDEREHRFLASEESQGSRNS SPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFVLTMEYK	438
IL-2	ELCLYDPPEVPNATFKALS YKNGTILNCECKRGFRRLKE LVYMRCLGNSWSSNCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKE RKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHF VVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWT QPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTT DFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ	439
IL-2	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGHIYPGSDTRYSPSFQGGVTVISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYCARQQVAGMLDYWGQGTTVT VSS	440
IL-2	GMLSLAVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSC QVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQ KLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMA PISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSP GHTWEEAPLLTLKQKQEWICLELTPDTQYEFQVRVKPL QAFRTL TGH	441
IL-2	GMLSLELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRG FRRIKSGSLYMLCTGSSSHSSWDNQCQCTSSATRSTTKQ VTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVC K MTHGKTRWTQPQLICTGE	442
IL-2	GMLSLELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRG FRRIKSGSLYMLCTGSSSHSSWDNQCQCTSSATRSTTKQ VTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVC K MTHGKTRWTQPQLICTGEAS	443

IL-2	GMLSLELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRG FRRIKSGSLYMLCTGSSSHSSWDNQCQCTSSATRSTTKQ VTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVC KMTGKTRWTQPQLICTGEASGGGGHHHHHH	444
IL-2	GMLSLELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRG FRRIKSGSLYMLCTGSSSHSSWDNQCQCTSSATRSTTKQ VTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVC KMTGKTRWTQPQLICTGEAS	445
IL-2	GMLSLELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRG FRRIKSGSLYMLCTGSSSHSSWDNQCQCTSSATRSTTKQ VTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVC KMTGKTRWTQPQLICTGEASGGGGHHHHHH	446
IL-2	LNTTILTPNGNEDTTADFFLTMTPTDSLVSSTLPLPEVQC FVFNVEYMNCTWNSSEPQPTNLTLHYWYKNSDNDKV QKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHL YQTFVVQLQDPREPR RQATQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSQSLELNWNNR FLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDYRHKFSLPSVDG QKRYTFRVRSRFNPLCGSAQHWSEWSHPIHWGSNTSKE NPFLFALEAV	447
IL-2	MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAELCDDDPPEIPHATFKA MAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQ PVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQC VQGYRALHRGPAESVCKMTGKTRWTQPQLICTGEMET SQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATM ETSIFTTEYQVAVAGCVLLISVLLLSGLTWQRRQRKSRR TI	448

IL-2	MLSLELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGF RRIKSGSLYMLCTGSSSHSSWDNQCQCTSSATRSTTKQV TPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWE NEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCK MTHGKTRWTQPQLICTGE	449
IL-2	QKLTTVDI	450
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDWLGEADYGMDVW GQGTTVTVSS	451
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGEQWRGFDYWGQG TTVTVSS	452
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQEQWRLAFDYWGQ GTTVTVSS	453
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAVAGTGRDYYYYG MDVWGQGTTVTVSS	454
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDSSGYYYGEDF DYWGQGTTVTVSS	455
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWELEDYGMDVWG QGTTVTVSS	456
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK	457

	NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNWGSDAFDIWGQGT TVTSS	
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDDFWGEADYGMDVW GQGTTVTSS	458
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRISITPFDYWGQGT TVTSS	459
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDDFWSDYPFDYWGQ GTTVTSS	460
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWFGEADYGMDVW GQGTTVTSS	461
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDSSGYFGEFD YWGQGTTVTSS	462
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVTVIWYDGSNEYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTVAGTGRDYYYYG MDVWGQGTTVTSS	463
IL-2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYGMHWVR QAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDFDSHYGMDVWGQ GTTVTSS	464
IL-2	SHYFER	465

IL-2	TLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLHYWY KNSDNDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHLYQTFVV QLQDPREPRRQATQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSESQ LELNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDYRH KFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFPNPLCGSAQHWSEWSPIH WGSNT	466
IL-2	TLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLHYWY KNSDNDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHLYQTFVV QLQDPREPRRQATQMLKLQNLVI	467
IL-2	WSSKVLMSANEDIKADLILTSTAPEHLSAPTLPLPEVQC FVFNIEYMNCTWNSSSEPQATNLTLHYRYKVSDNNTFQE CSHYLFSKEITSGCQIQKEDIQLYQTFVVQLQDPQKPQRR AVQKLNQNLVIPRAPENLTLNLSESQLELRWKSRIKE RCLQYLVQYRSNRDRSWTELIVNHEPRFSLPSVDELKRY TFRVRSRYNPICGSSQQWSKWSQPVHWGSHTVEENPSLF ALEA	468
IL-2 и IL-15	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMLAPISLQVV HVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTT WSPWSQPLAFRTKPAALGKDTGGGGSGGGGSGGGGSIS SGLLSSGGSGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSLNTTILTPN GNEDTTADFFLTTMPTDSLVSSTLPLPEVQCFVFNVEYM NCTWNSSSEPQPTNLTLHYWYKNSDNDKVQKCSHYLFSE EITSGCQLQKKEIHLYQTFVVQLQDPREPRRQATQMLKL QNLVIPWAPENLTLHKLSESQLELNWNNRFLNHCLEHLV QYRTDWDHSWTEQSVDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRS RFNPLCGSAQHWSEWSPIHGWGSNTSKENPFLFAEA	469
IL-2 и IL-15	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMLAPISLQVV HVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTT	470

	WSPWSQPLAFRTKPAALGKDTGGGGSGGGGSGGGGSIS SGLLSSGGSGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSAVNGTSQFT CFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQVHAWPDRRRWNQ TCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCR EGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRCNI SWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQK QEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLA FRTKPAALGKDT	
IL-2 и IL-15	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPESQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVV HVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTT WSPWSQPLAFRTKPAALGKDT	471
IL-2 и IL-15	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDHQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVV HVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTT WSPWSQPLAFRTKPAALGKDT	472
IL-2 и IL-15	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTQDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVV HVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTT WSPWSQPLAFRTKPAALGKDT	473
IL-2 и IL-15	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTFDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVV HVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTT WSPWSQPLAFRTKPAALGKDT	474

IL-2 и IL-15	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVV HVETHRCNISWEISQASHYFQRHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTT WSPWSQPLAFRTKPAALGKDT	475
IL-2 и IL-15	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVV HVETHRCNISWEISQASHYFQRRLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTT WSPWSQPLAFRTKPAALGKDT	476
IL-2 и IL-15	AVNGTSQFTCFYNSYANISCVWSQDGALQDTSCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDI VTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVV HVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE APLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTT WSPWSQPLAFRTKPAALGKDT	477
IL-2, IL-15, и IL-21	LNTTILTPNGNEDTTADFFLTTMPTDSL SVSTLPLPEVQC FVFNVEYMNCTWNSSEPPQPTNLTLHYWYKNSDNDKV QKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHL YQTFVVQLQDPREPR RQATQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSESQLELNWNNR FLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDYRHKFSLPSVDG QKRYTFRVRSRFNPLCGSAQHWSEWSHPIHWGSNTSKE NPFLFALEA	478
IL-21	CPDLVCYTDYLQTVICILEMWNLHPSTLTLTWQDQYEEL KDEATSCSLHRSAHNATHATYTCHMDVFHFMADDIFSV NITDQSGNYSQECGSFLLAESIKPAPPFNVTVTFSGQYNIS WRSDYEDPAFYMLKGLQYELQYRNRGDPWAVSPRRK LISVDSRSVSLPLEFRKDSSYELQVRAGPMPGSSYQGT WSEWSDPVIFQTQSEELKE	479

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Необходимо понимать, что хотя данное изобретение было изложено в сочетании с

его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, но не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС – англ.: activatable cytokine construct), которая включает первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, где:
 - (a) первая мономерная конструкция содержит первую пептидную маску (PM1 – англ.: PM, peptide mask), первый зрелый белок-цитокин (CP1 – англ.: CP, mature cytokine protein), первый и третий расщепляемые фрагменты (CM1 и CM3 – англ.: CM, cleavable moiety) и первый домен димеризации (DD1 – англ.: DD, dimerization domain), где CM1 расположен между CP1 и DD1 и CM3 расположен между PM1 и CP1; и
 - (b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый белок-цитокин (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2), где CM2 расположен между CP2 и DD2;где DD1 и DD2 связываются друг с другом, образуя, таким образом, димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции, АСС характеризуется тем, что она имеет, по меньшей мере, одну из следующих характеристик:
 - (i) структурная схема в направлении от N-конца к C-концу, включающая: PM1-CM3-CP1-CM1-DD1 и CP2-CM2-DD2, где DD1 и DD2 димеризованы;
 - (ii) при этом первая мономерная конструкция характеризуется тем, что CP1 и DD1 связаны связывающей областью не более чем из 18 аминокислот, так что связывающая область не более чем из 18 аминокислот включает CM3;
 - (iii) при этом вторая мономерная конструкция характеризуется тем, что CP2 и DD2 связаны связывающей областью не более чем из 18 аминокислот, так что связывающая область не более чем из 18 аминокислот включает CM2;
 - (iv) где каждая из PM1 и PM2 содержит менее 40 аминокислот;
 - (v) где каждая из PM1 и PM2 содержит от 13 до 49 аминокислот; и/или
 - (vi) где каждая из PM1 и PM2 не является рецептором для CP1 и CP2 и где каждая из PM1 и PM2 не является фрагментом рецептора для CP1 и CP2.
2. АСС по п. 1, отличающаяся тем, что вторая мономерная конструкция дополнительно содержит вторую пептидную маску (PM2) и четвертый расщепляемый фрагмент (CM4), где CM4 расположен между PM2 и CP2.

3. АСС по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит первый полипептид, содержащий PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1.
4. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–3, отличающаяся тем, что вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, содержащий CP2, CM2 и DD2.
5. АСС по п. 2, отличающаяся тем, что вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, содержащий PM2, CM4, CP2, CM2 и DD2.
6. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–5, отличающаяся тем, что CP1 и/или CP2 по отдельности выбран(-ы) из группы, состоящей из: интерферона, интерлейкина, GM-CSF, G-CSF, LIF, OSM, CD154, LT- β , TNF- α , TNF- β , 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE, TGF- β 1, TGF- β 1, TGF- β 3, Еро, Тро, Flt-3L, SCF, M-CSF, и MSP, необязательно, где CP1 и/или CP2 независимо выбраны из IL-2, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, GM-CSF, TGF-бета, LIGHT, GITR-L, CD40L, CD27L, 4-1BB-L, OX40 и OX40L.
7. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–6, отличающаяся тем, что:
 - PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323 и 331–369, и CP1 представляет собой интерферон;
 - PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323, и 331–364, и CP1 представляет собой интерферон альфа;
 - PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 362–364, а CP1 представляет собой интерферон бета;
 - PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 366–369, а CP1 представляет собой интерферон гамма;
 - PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370–374, и CP1 представляет собой IL-12;
 - PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 375–382, 469–477, 478, и CP1 представляет собой IL-15;
 - PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 383–468, 469–478, и CP1 представляет собой IL-2; или

- PM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 478 и 479, а CP1 представляет собой IL-21.
8. АСС по любому одному или комбинации из пп. 2–7, отличающаяся тем, что:
- PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323, и 331–369, и CP2 представляет собой интерферон;
- PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328, 329, 323 и 331–364, а CP2 представляет собой интерферон альфа;
- PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 362–364, а CP2 представляет собой интерферон бета;
- PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 331–360, 366–369, а CP2 представляет собой интерферон гамма;
- PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 370–374, а CP2 представляет собой IL-12;
- PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 375–382, 469–477, 478, и CP2 представляет собой IL-15;
- PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 383–468, 469–478, и CP2 представляет собой IL-2; или
- PM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 478 и 479, а CP2 представляет собой IL-21.
9. АСС по любому одному или комбинации из пп. 2–8, отличающаяся тем, что PM1, PM2, или PM1 и PM2 содержат SEQ ID NO: 323.
10. АСС по любому одному или комбинации из пп. 2–9, отличающаяся тем, что PM1, PM2, или PM1 и PM2 содержат SEQ ID NO: 331.
11. АСС по любому одному или комбинации из пп. 2–10, отличающаяся тем, что PM1, PM2, или PM1 и PM2 содержат SEQ ID NO: 332.
12. АСС по любому одному или комбинации из пп. 2–11, содержащая связывающую область маски между PM1 и CP1, содержащую 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 аминокислоты.

13. АСС по любому одному или комбинации из пп. 2–12, содержащая связывающую область маски между РМ2 и СР2, содержащую 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 аминокислоты.
14. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–13, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 представляют собой пару, выбранную из группы, состоящей из: пары доменов Fc; домена "sushi" из альфа-цепи рецептора IL-15 человека (IL15R α) и растворимого IL-15; барназы и барнстара; РКА и АКАР; модулей адаптера / стыковочной метки на основе мутированных фрагментов РНКазы I; эпитопа и sdAb; эпитопа и scFv; модулей SNARE, основанных на взаимодействии белков синтаксина, синаптоагмина, синаптобrevина и SNAP25; антигенсвязывающего домена и эпитопа.
15. АСС по п. 14, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc.
16. АСС по п. 15, отличающаяся тем, что пара доменов Fc представляет собой пару доменов Fc человека.
17. АСС по п. 16, отличающаяся тем, что домены Fc человека представляют собой домены Fc IgG1 человека, домены Fc IgG2 человека, домены Fc IgG3 человека или домены Fc IgG4 человека.
18. АСС по п. 17, отличающаяся тем, что домены Fc человека представляют собой домены Fc IgG4 человека.
19. АСС по п. 16, отличающаяся тем, что домены Fc человека содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 3.
20. АСС по п. 19, отличающаяся тем, что домены Fc человека содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 3.
21. АСС по п. 20, отличающаяся тем, что домены Fc человека содержат SEQ ID NO: 3.

22. АСС по п. 14, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 содержат SEQ ID NO: 318 и 319, соответственно.
23. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–21, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 являются одинаковыми.
24. АСС по п. 14, отличающаяся тем, что DD1 содержит антигенсвязывающий домен, а DD2 содержит соответствующий эпитоп.
25. АСС по п. 24, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен к His-метке, и при этом DD2 содержит His-метку.
26. АСС по п. 24, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).
27. АСС по п. 24, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb).
28. АСС по п. 14, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из DD1 и DD2 содержит заместитель домена димеризации, выбранный из группы, состоящей из неполипептидного полимера и малой молекулы.
29. АСС по п. 28, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 содержат неполипептидные полимеры, ковалентно связанные друг с другом.
30. АСС по п. 29, отличающаяся тем, что неполипептидный полимер представляет собой серосодержащий полиэтиленгликоль, и при этом DD1 и DD2 ковалентно связаны друг с другом посредством одной или более дисульфидных связей.
31. АСС по п. 28, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из DD1 и DD2 содержит малую молекулу.
32. АСС по п. 31, отличающаяся тем, что малая молекула представляет собой биотин.

33. АСС по п. 32, отличающаяся тем, что DD1 содержит биотин, а DD2 содержит авидин.
34. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–33, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 представляют собой зрелые цитокины.
35. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–33, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 содержат сигнальный пептид.
36. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–35, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 являются одинаковыми.
37. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–35, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 являются разными.
38. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–35, отличающаяся тем, что CP1 и/или CP2 представляет/представляют собой интерферон.
39. АСС по п. 38, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 представляют собой интерферон.
40. АСС по п. 38, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 представляют собой разные интерфероны.
41. АСС по п. 38, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 представляют собой один и тот же интерферон.
42. АСС по любому одному или комбинации из пп. 38–41, отличающаяся тем, что интерферон(-ы) представляет собой зрелый интерферон человека дикого типа.
43. АСС по любому одному или комбинации из пп. 38–42, отличающаяся тем, что интерферон(-ы) выбран(-ы) из группы, состоящей из интерферона альфа, интерферона бета, интерферона омега и интерферона тау.
44. АСС по п. 43, отличающаяся тем, что интерфероны представляют собой интерферон

альфа.

45. АСС по п. 44, отличающаяся тем, что интерферон(-ы) выбран(-ы) из группы, состоящей из интерферона альфа-2а, интерферона альфа-2b и интерферона альфа-n3.
46. АСС по п. 45, отличающаяся тем, что интерферон(-ы) представляет собой интерферон альфа-2b.
47. АСС по п. 46, отличающаяся тем, что СР1 и/или СР2 содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 1.
48. АСС по п. 47, отличающаяся тем, что СР1 и/или СР2 содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1.
49. АСС по п. 48, отличающаяся тем, что СР1 и/или СР2 содержат последовательность SEQ ID NO: 1.
50. АСС по п. 43, отличающаяся тем, что интерферон представляет собой интерферон бета.
51. АСС по п. 50, отличающаяся тем, что интерферон бета выбран из группы, состоящей из интерферона бета-1а и интерферона бета-1b.
52. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–51, отличающаяся тем, что СР1 и/или СР2 содержат домен IFab.
53. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–38, отличающаяся тем, что СР1 и/или СР2 содержат интерлейкин.
54. АСС по п. 53, отличающаяся тем, что интерлейкин выбран из группы, состоящей из IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-18, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-10, IL-20, IL-21, IL-14, IL-16, и IL-17.
55. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–54, отличающаяся тем, что каждый

из CM1 и CM2 содержит в общей сложности от около 3 аминокислот до около 15 аминокислот.

56. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–55, отличающаяся тем, что один или более из CM1, CM2, CM3 и CM4 содержат субстраты для разных протеаз.
57. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–56, отличающаяся тем, что CM1, CM2 и CM3 содержат субстраты для одной и той же протеазы.
58. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–57, отличающаяся тем, что протеаза(-ы) выбрана(-ы) из группы, состоящей из: ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, BACE, ренина, катепсина D, катепсина E, каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 14, катепсина B, катепсина C, катепсина K, катепсина L, катепсина S, катепсина V/L2, катепсина X/Z/P, крузипаина, легумаина, отубаина-2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, KLK14, меприна, неприлизина, PSMA, BMP-1, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-24, MMP-26, MMP-27, активированного белка C, катепсина A, катепсина G, химазы, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, эластазы, гранзима B, гуанидинобензоатазы, HtrA1, нейтрофильной лиазы человека, лактоферрина, марапсина, NS3/4A, PACE4, плазмина, PSA, tPA, тромбина, триптазы, uPA, DESC1, DPP-4, FAP, гепсина, матриптазы-2, MT-SP1/матриптазы, TMPRSS2, TMPRSS3, и TMPRSS4.
59. АСС по п. 58, отличающаяся тем, что протеаза(-ы) выбрана(-ы) из группы, состоящей из: uPA, легумаина, MT-SP1, ADAM17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, и MMP-14.
60. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–57, отличающаяся тем, что CM1, CM2, CM3 и/или CM4 содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из: LSGRSDNH (SEQ ID NO: 5), TGRGPSWV (SEQ ID NO: 6), PLTGRSGG (SEQ ID NO: 7), TARGPSFK (SEQ ID NO: 8), NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 9), NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 10), TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 11), TSGRSANP

(SEQ ID NO: 12), VHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 13), AVGLLAPP (SEQ ID NO: 14), AQNLLGMV (SEQ ID NO: 15), QNQALRMA (SEQ ID NO: 16), LAAPLGLL (SEQ ID NO: 17), STFPFGMF (SEQ ID NO: 18), ISSGLLSS (SEQ ID NO: 19), PAGLWLDP (SEQ ID NO: 20), VAGRSMRP (SEQ ID NO: 21), VVPEGRRS (SEQ ID NO: 22), ILPRSPAF (SEQ ID NO: 23), MVLGRSLL (SEQ ID NO: 24), QGRAITFI (SEQ ID NO: 25), SPRSIMLA (SEQ ID NO: 26), SMLRSMPL (SEQ ID NO: 27), ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 29), ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 30), LSGRSGNH (SEQ ID NO: 31), SGRSANPRG (SEQ ID NO: 32), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), LSGRSDIH (SEQ ID NO: 34), LSGRSDQH (SEQ ID NO: 35), LSGRSDTH (SEQ ID NO: 36), LSGRSDYH (SEQ ID NO: 37), LSGRSDNP (SEQ ID NO: 38), LSGRSANP (SEQ ID NO: 39), LSGRSANI (SEQ ID NO: 40), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 41), MIAPVAYR (SEQ ID NO: 42), RPSPMWAY (SEQ ID NO: 43), WATPRPMR (SEQ ID NO: 44), FRLLDWQW (SEQ ID NO: 45), ISSGL (SEQ ID NO: 46), ISSGLLS (SEQ ID NO: 47), ISSGLL (SEQ ID NO: 48), ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 49), AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 50), AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 51), ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 52), ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 53), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 55), ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 56), ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 57), ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 58), ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 59), AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 60), AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 61), AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 62), AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 63), AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 64), AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 65), AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 66), AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 67), ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68), AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 69), GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 70), GLSGRSDNHGGVHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 71), LSGRSDNHGGVHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 72), ISSGLSS (SEQ ID NO: 73), PVGYTSSL (SEQ ID NO: 74), DWLYWPGI (SEQ ID NO: 75), LKAAPRWA (SEQ ID NO: 76), GPSHLVLT (SEQ ID NO: 77), LPGGLSPW (SEQ ID NO: 78), MGLFSEAG (SEQ ID NO: 79), SPLPLRVP (SEQ ID NO: 80), RMHLRSLG (SEQ ID NO: 81), LLAPSHRA (SEQ ID NO: 82), GPRSFGL (SEQ ID NO: 83), GPRSGF (SEQ ID NO: 84), SARGPSRW (SEQ ID NO: 85), GGWHTGRN (SEQ ID NO: 86), HTGRSGAL (SEQ ID NO: 87), AARGPAIH (SEQ ID NO: 88), RGPAPNPM (SEQ ID NO: 89), SSRGPAYL (SEQ ID NO: 90), RGPATPIM (SEQ ID NO: 91), RGPA (SEQ ID NO: 92),

GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 93), FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 94), SPLTGRSG (SEQ ID NO: 95), SAGFSLPA (SEQ ID NO: 96), LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 97), SGGPLGVR (SEQ ID NO: 98), PLGL (SEQ ID NO: 99) и SGRSDNI (SEQ ID NO: 100).

61. АСС по п. 60, отличающаяся тем, что CM1, CM2, CM3 и/или CM4 содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из: ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), SGRSDNI (SEQ ID NO: 100) и ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68).
62. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–61, отличающаяся тем, что протеаза(-ы) продуцируется(-ются) опухолью у субъекта.
63. АСС по п. 62, отличающаяся тем, что у субъекта было диагностировано или идентифицировано злокачественное новообразование.
64. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–63, отличающаяся тем, что CP1 и CM1 непосредственно примыкают друг к другу в первой мономерной конструкции.
65. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–64, отличающаяся тем, что CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу в первой мономерной конструкции.
66. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–65, отличающаяся тем, что CP2 и CM2 непосредственно примыкают друг к другу во второй мономерной конструкции.
67. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–66, отличающаяся тем, что CM2 и DD2 непосредственно примыкают друг к другу во второй мономерной конструкции.
68. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–63, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер.
69. АСС по п. 68, отличающаяся тем, что по меньшей мере один линкер представляет собой линкер L1, расположенный между PM1 и CM3, и/или линкер L2, расположенный между CM3 и CP1.

70. АСС по п. 68, отличающаяся тем, что вторая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер.
71. АСС по п. 70, отличающаяся тем, что по меньшей мере один линкер представляет собой линкер L3, расположенный между РМ2 и СМ4, и/или линкер L4, расположенный между СМ4 и СР2.
72. АСС по п. 71, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит линкер L1, а вторая мономерная конструкция содержит линкер L3.
73. АСС по п. 72, отличающаяся тем, что L1 и L3 являются одинаковыми.
74. АСС по п. 71, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит линкер L2, а вторая мономерная конструкция содержит линкер L4.
75. АСС по п. 74, отличающаяся тем, что L2 и L4 являются одинаковыми.
76. АСС по любому одному или комбинации из пп. 68–75, отличающаяся тем, что каждый линкер имеет общую длину от 1 аминокислоты до около 15 аминокислот.
77. АСС по п. 76, отличающаяся тем, что каждый линкер имеет общую длину по меньшей мере 5 аминокислот.
78. АСС по п. 68, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер, при этом каждый линкер независимо выбран из группы, состоящей из GSSGSGGSGG (SEQ ID NO: 210); GGGS (SEQ ID NO: 2); GGGSGGGS (SEQ ID NO: 211); GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 212); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213); GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214); GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 215); GGGGS (SEQ ID NO: 216); GS; GGGSGS (SEQ ID NO: 217); GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 218); GGLDPKGGGGS (SEQ ID NO: 219); PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 220); SKYGPPCPPCPAPEFLG (SEQ ID NO: 221); GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 222); GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 223); GSTSGSGKSSEGSGSTKG (SEQ ID NO: 224); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 225); GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226);

226); (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 227), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 228), (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 216), где каждый n представляет собой целое число, равное по меньшей мере единице; GGS (SEQ ID NO: 229); GGS (SEQ ID NO: 230); GSG (SEQ ID NO: 231); GSG (SEQ ID NO: 232); GGS (SEQ ID NO: 233); GSS (SEQ ID NO: 234); GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213); GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214); GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226); SGG (SEQ ID NO: 327) и SGGG (SEQ ID NO: 492).

79. АСС по п. 78, отличающаяся тем, что линкер содержит последовательность GGS (SEQ ID NO: 2).
80. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–79, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит в направлении от N-конца к С-концу РМ1, СМ3, СР1, СМ1 и DD1.
81. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–79, отличающаяся тем, что первый полипептид содержит в направлении от С-конца к N-концу РМ1, СМ3, СР1, СМ1 и DD1.
82. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–81, отличающаяся тем, что второй полипептид содержит в направлении от N-конца к С-концу СР2, СМ2 и DD2.
83. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–82, отличающаяся тем, что второй полипептид содержит в направлении от С-конца к N-концу СР2, СМ2 и DD2.
84. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–36, 38, 39 или 41–83, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция являются одинаковыми, и при этом каждая из первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции имеет только одну пептидную маску.
85. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–79, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция содержит в направлении от N-конца к С-концу РМ1, необязательный линкер, СМ3, необязательный линкер, СР1, СМ1 и DD1, при этом СР1 и СМ1 непосредственно примыкают друг к другу, при этом СМ1 и DD1

непосредственно примыкают друг к другу, при этом CM1 представляет собой пептид, состоящий не более чем из 10 аминокислот, при этом вторая мономерная конструкция является такой же, как и первая мономерная конструкция, и при этом первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом через по меньшей мере две дисульфидные связи.

86. АСС по п. 85, отличающаяся тем, что каждый из DD1 и DD2 представляет собой домен Fc человека, имеющий N-конец в положении цистеина 216, пронумерованном в соответствии с нумерацией EU.
87. АСС по п. 85 или п. 86, отличающаяся тем, что CM1 представляет собой пептид, состоящий не более чем из 7 аминокислот.
88. АСС по любому одному или комбинации из пп. 85–87, отличающаяся тем, что CP1 и CP2 содержат аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1.
89. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–88, отличающаяся тем, что АСС характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2.
90. АСС по п. 89, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна из активности CP1 и CP2 представляет собой уровень пролиферации клеток лимфомы.
91. АСС по п. 89, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна из активности CP1 и CP2 представляет собой уровень активации пути JAK/STAT/ISGF3 в клетке лимфомы.
92. АСС по п. 89, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна активность представляет собой уровень продукции SEAP в клетке лимфомы.
93. АСС по п. 89, отличающаяся тем, что АСС характеризуется по меньшей мере 2-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и CP2 по сравнению с контрольным уровнем.

94. АСС по п. 93, отличающаяся тем, что АСС характеризуется по меньшей мере 5-кратным снижением по меньшей мере одной активности СР1 и/или СР2 по сравнению с контрольным уровнем.
95. АСС по п. 94, отличающаяся тем, что АСС характеризуется по меньшей мере 10-кратным снижением по меньшей мере одной активности СР1 и/или СР2 по сравнению с контрольным уровнем.
96. АСС по п. 95, отличающаяся тем, что АСС характеризуется по меньшей мере 500-кратным снижением по меньшей мере одной активности СР1 и/или СР2 по сравнению с контрольным уровнем.
97. АСС по любому одному или комбинации из пп. 89–95, отличающаяся тем, что контрольный уровень по меньшей мере одной активности СР1 и/или СР2 представляет собой активность СР1 и/или СР2 в АСС после воздействия на АСС протеазы (протеаз).
98. АСС по любому одному или комбинации из пп. 89–97, отличающаяся тем, что контрольный уровень по меньшей мере одного СР1 и/или СР2 представляет собой соответствующую активность СР1 и/или СР2 соответствующего зрелого цитокина дикого типа.
99. АСС по любому одному или комбинации из пп. 89–98, отличающаяся тем, что АСС характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия протеазы (протеаз), при этом продукт расщепления имеет по меньшей мере одну активность СР1 и/или СР2.
100. АСС по п. 99, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна активность СР1 и/или СР2 представляет собой антипролиферативную активность.
101. АСС по п. 100, отличающаяся тем, что контрольный уровень представляет собой значение EC50, и при этом отношение EC50 (продукт расщепления) к EC50 (контрольный уровень) составляет менее около 10, или менее около 9, или менее

около 8, или менее около 7, или менее около 6, или менее около 5, или менее около 4, или менее около 3, или менее около 2, или менее около 1,5, или менее около 1,0.

102. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–101, отличающаяся тем, что первая мономерная конструкция характеризуется тем, что CP1 и DD1 связаны связывающей областью не более чем из 12 аминокислот, так что связывающая область не более чем из 12 аминокислот включает CM3.
103. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–102, отличающаяся тем, что вторая мономерная конструкция характеризуется тем, что CP2 и DD2 связаны связывающей областью не более чем из 12 аминокислот, так что связывающая область не более чем из 12 аминокислот включает CM2.
104. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–103, отличающаяся тем, что PM1 содержит менее 50 аминокислот.
105. АСС по любому одному или комбинации из пп. 2–104, отличающаяся тем, что PM2 содержит менее 50 аминокислот.
106. АСС по п. 105, отличающаяся тем, что каждый из PM1 и PM2 содержит менее 19 аминокислот.
107. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–103, отличающаяся тем, что PM1 не является пептидом, ассоциированным с латентностью, и PM2 не является пептидом, ассоциированным с латентностью.
108. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–103, отличающаяся тем, что PM1 не является цитокином, а PM2 не является цитокином.
109. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–103, отличающаяся тем, что PM1 не является рецептором цитокина и не является фрагментом рецептора цитокина.
110. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–103 и 109, отличающаяся тем, что PM2 не является рецептором цитокина и не является фрагментом рецептора цитокина.
111. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–103, отличающаяся тем, что PM1 не является альбумином, а PM2 не является альбумином.

112. Композиция, содержащая АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–111.
113. Композиция по п. 112, отличающаяся тем, что представляет собой фармацевтическую композицию.
114. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащие по меньшей мере одну дозу композиции по п. 112 или п. 113.
115. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества АСС по любому из пп. 1–96 или композиции по п. 112 или п. 113.
116. Способ по п. 115, отличающийся тем, что у субъекта идентифицировано или диагностировано злокачественное новообразование.
117. Способ по п. 116, отличающийся тем, что злокачественное новообразование представляет собой лимфому.
118. Способ по п. 117, отличающийся тем, что лимфома представляет собой лимфому Беркитта.
119. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит СР1 и СМ1 из АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–111.
120. Нуклеиновая кислота по п. 109, отличающаяся тем, что полипептид дополнительно содержит DD1 по любому одному или комбинации из пп. 1–21 или пп. 28–111.
121. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит СР2 и СМ2 из АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–111.
122. Нуклеиновая кислота по п. 111, отличающаяся тем, что полипептид дополнительно содержит DD2 по любому одному или комбинации из пп. 1–21 или пп. 28–111.
123. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому одному или комбинации из пп.

119–122.

124. Вектор по п. 123, отличающийся тем, что представляет собой вектор экспрессии.
125. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому одному или комбинации из пп. 119–122, или вектор по п. 123 или п. 124.
126. Пара нуклеиновых кислот, которые вместе кодируют полипептид, содержащий СР1 и СМ1 из первой мономерной конструкции, и полипептид, содержащий СР2 и СМ2 из второй мономерной конструкции по любому одному или комбинации из п. 1–111.
127. Пара векторов, которые вместе образуют пару нуклеиновых кислот по п. 126.
128. Пара векторов по п. 127, отличающаяся тем, что представляет собой пару векторов экспрессии.
129. Клетка, содержащая пару нуклеиновых кислот по п. 126 или пару векторов по п. 127 или п. 128.
130. Способ получения АСС, включающий:
- а. культивирование клетки по п. 125 или п. 129 в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для получения АСС; и
 - б. выделение АСС из клетки или жидкой культуральной среды.
131. Способ по п. 130, дополнительно включающий: изолирование АСС, выделенной из клетки или жидкой культуральной среды.
132. Способ по п. 131, дополнительно включающий: введение изолированной АСС в фармацевтическую композицию.
133. АСС, полученная с помощью способа по п. 130.
134. Композиция, содержащая АСС по п. 133.

135. Композиция по п. 134, отличающаяся тем, что представляет собой фармацевтическую композицию.
136. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащие по меньшей мере одну дозу композиции по п. 134 или п. 135.
137. АСС по любому одному или комбинации из пп. 89–101, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна активность СР1 и/или СР2 представляет собой аффинность связывания СР1 и/или СР2 с его когнатным рецептором, определяемую с помощью поверхностного плазмонного резонанса.
138. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС), содержащая первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, отличающаяся тем, что:
- (a) первая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий первую пептидную маску (РМ1), первый зрелый белок-цитокин (СР1), первый и третий расщепляемые фрагменты (СМ1 и СМ3) и первый домен димеризации (DD1);
 - (b) вторая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий вторую пептидную маску (РМ2), второй зрелый белок-цитокин (СР2), второй и четвертый расщепляемые фрагменты (СМ2 и СМ4) и второй домен димеризации (DD2);
 - (c) первая мономерная конструкция содержит в направлении от N-конца к С-концу РМ1, СМ3, СР1, СМ1 и DD1, дополнительно при этом:
 - (i) РМ1 содержит не более 20 аминокислот и связывается с СР1,
 - (ii) СМ1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу,
 - (iii) СР1 и СМ1 непосредственно примыкают друг к другу,
 - (iv) СМ1 содержит не более 12 аминокислот,
 - (v) каждый из СМ1 и СМ3 функционирует в качестве субстрата для протеазы,и
 - (vi) СР1 представляет собой зрелый интерферон;
 - (d) дополнительно при этом:
 - (i) вторая мономерная конструкция является такой же, как и первая мономерная конструкция,
 - (ii) DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc IgG человека;

- (iii) DD1 и DD2 связываются друг с другом через по меньшей мере одну дисульфидную связь, тем самым образуя гомодимер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и
- (е) АСС характеризуется сниженным уровнем активности интерферона по сравнению с соответствующим интерфероном дикого типа или соответствующим пэгилированным интерфероном.
139. АСС по п. 138, отличающийся тем, что СР1 представляет собой зрелый интерферон-альфа, а РМ1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична SEQ ID NO: 323.
140. АСС по п. 138 или п. 139, отличающаяся тем, что каждый из СМ1 и СМ3 независимо функционирует в качестве субстрата урокиназы (uPa) и/или матриксной металлопротеиназы (ММР).
141. АСС по п. 140, отличающаяся тем, что каждый из СМ1 и СМ3 независимо функционирует в качестве субстрата урокиназы (uPa) и/или ММР-14.
142. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–141, отличающаяся тем, что зрелый интерферон представляет собой зрелый интерферон альфа человека.
143. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–142, отличающаяся тем, что зрелый интерферон альфа представляет собой зрелый интерферон альфа-2b.
144. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–143, отличающаяся тем, что зрелый интерферон альфа представляет собой укороченную форму зрелого интерферона альфа-2b дикого типа.
145. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–144, отличающаяся тем, что зрелый интерферон содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 1.
146. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–145, отличающаяся тем, что зрелый интерферон содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

147. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–146, отличающаяся тем, что каждый из СМ1 и СМ3 содержит не более 8 аминокислот.
148. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–147, отличающаяся тем, что СМ1 и СМ3 являются одинаковыми.
149. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–148, отличающаяся тем, что каждый из СМ1 и СМ3 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 41.
150. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–148, отличающаяся тем, что каждый из СМ1 и СМ3 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 68, и SEQ ID NO: 100.
151. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–150, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc IgG4 человека.
152. АСС по п. 151, отличающаяся тем, что DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc IgG4 человека, усеченных на N-конце до цистеина 226, пронумерованного согласно нумерации EU.
153. АСС по п. 151 или п. 152, отличающаяся тем, что домены Fc IgG4 человека содержат мутацию S228P, пронумерованную согласно нумерации EU.
154. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–153, отличающаяся тем, что каждая из DD1 и DD2 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 3.
155. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–154, отличающаяся тем, что каждая из DD1 и DD2 содержит последовательность SEQ ID NO: 3.
156. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–155, отличающаяся тем, что первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом через по

меньшей мере две дисульфидные связи.

157. АСС по п. 156, отличающаяся тем, что первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом через по меньшей мере три дисульфидные связи.
158. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–157, отличающаяся тем, что: первая мономерная конструкция дополнительно содержит первую сигнальную последовательность на N-конце, а вторая мономерная конструкция дополнительно содержит вторую сигнальную последовательность на N-конце.
159. АСС по п. 158, отличающаяся тем, что каждая из первой и второй сигнальных последовательностей содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 244.
160. АСС по п. 159, отличающаяся тем, что каждая из первой и второй сигнальных последовательностей содержит последовательность SEQ ID NO: 244.
161. АСС по любому одному или комбинации из пп. 158–160, отличающаяся тем, что: первая мономерная конструкция дополнительно содержит первый спейсер, расположенный между первой сигнальной последовательностью и РМ1, а вторая мономерная конструкция дополнительно содержит второй спейсер, расположенный между второй сигнальной последовательностью и РМ2, и при этом каждая из первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции имеет только одну пептидную маску.
162. АСС по п. 161, отличающаяся тем, что каждый из первого и второго спейсеров содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 256.
163. АСС по п. 162, отличающаяся тем, что каждый из первого и второго спейсеров содержит последовательность SEQ ID NO: 256.
164. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–163, дополнительно содержащая линкер L1 между РМ1 и СМ3 и/или линкер L2 между СМ3 и СР1, при этом каждый

из L1 и L2 независимо содержит последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичности с SEQ ID NO: 27 (где n=1), последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 324 или отсутствует.

165. АСС по п. 164, отличающаяся тем, что L1 содержит последовательность SEQ ID NO: 27 (где n=1), а L2 содержит последовательность SEQ ID NO: 324.
166. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–165, содержащая связывающую область, содержащую не более 12 аминокислот.
167. АСС по п. 166, отличающаяся тем, что связывающая область содержит от 7 до 12 аминокислот.
168. АСС по п. 166, отличающаяся тем, что связывающая область содержит 7 аминокислот.
169. АСС по любому одному или комбинации из 138–168, отличающаяся тем, что характеризуется по меньшей мере 2000-кратным снижением активности интерферона альфа по сравнению с интерфероном альфа дикого типа.
170. АСС по п. 169, отличающаяся тем, что характеризуется по меньшей мере 4000-кратным снижением активности интерферона альфа по сравнению с интерфероном альфа дикого типа.
171. АСС по п. 170, отличающаяся тем, что характеризуется по меньшей мере 5000-кратным снижением активности интерферона альфа по сравнению с интерфероном альфа дикого типа.
172. АСС по любому одному или комбинации из 138–168, отличающаяся тем, что характеризуется по меньшей мере 2000-кратным снижением активности интерферона альфа по сравнению с пэгилированным интерфероном альфа.
173. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–172, отличающаяся тем, что снижение активности интерферона определяют путем сравнения EC50 АСС с EC50 интерферона дикого типа или пэгилированного интерферона в анализе

антипролиферативной активности с использованием клеток лимфомы.

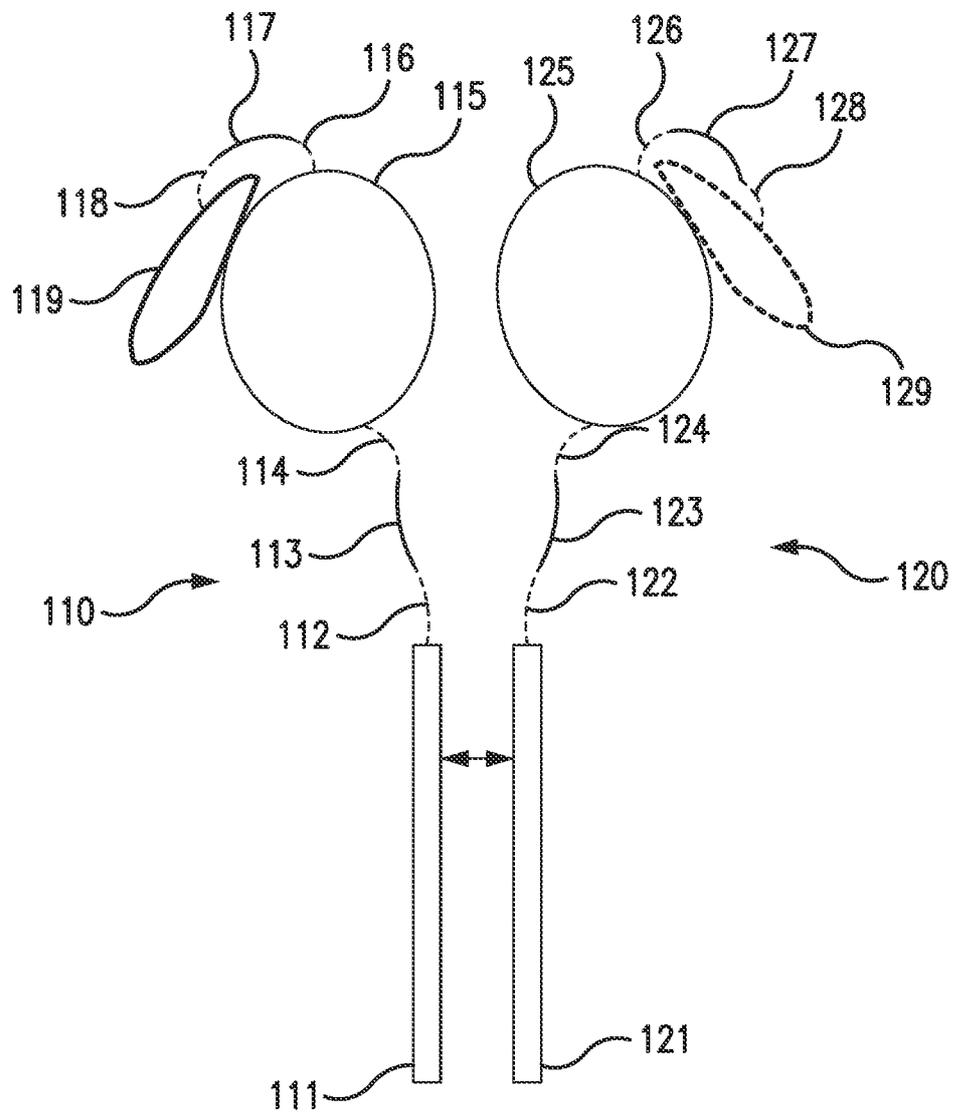
174. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–173, отличающаяся тем, что снижение активности интерферона определяют путем сравнения EC50 АСС с EC50 интерферона дикого типа или пэгилированного интерферона в анализе индукции продукции секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы с использованием клеток НЕК293, чувствительных к интерферону.
175. АСС по любому из пп. 138–174, отличающаяся тем, что АСС дополнительно характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия протеазы (протеаз), для которых СМ1 и СМ3 функционируют в качестве субстрата, при этом отношение активности соответствующего интерферона дикого типа к продукту расщепления составляет менее около 2.
176. АСС по п. 175, отличающаяся тем, что EC50 продукта расщепления примерно такая же, как EC50 соответствующего интерферона дикого типа.
177. АСС по п. 138, отличающаяся тем, что каждая из первой и второй мономерных конструкций содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 321, или при этом каждая из первой и второй мономерных конструкций содержит последовательность SEQ ID NO: 321, при этом АСС характеризуется по меньшей мере 1000-кратным снижением активности интерферона по сравнению с интерфероном альфа-2b дикого типа, и при этом АСС дополнительно характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия uPA, при этом продукт расщепления обладает примерно такой же активностью интерферона, что и интерферон альфа-2b дикого типа, при этом активность интерферона измеряют в анализе антипролиферативной активности с использованием клеток лимфомы или в анализе индукции продукции секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы с использованием клеток НЕК293, чувствительных к интерферону.
178. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС), содержащая первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, отличающаяся тем, что:
- (а) первая мономерная конструкция содержит первую пептидную маску (PM1), первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый и третий расщепляемые фрагменты

- (CM1 и CM3) и первый домен димеризации (DD1);
- (b) вторая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий вторую пептидную маску (PM2), второй зрелый белок-цитокин (CP2), второй и четвертый расщепляемые фрагменты (CM2 и CM4) и второй домен димеризации (DD2);
- (c) первая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу PM1, CM3, CP1, CM1 и DD1, дополнительно при этом:
- (i) PM1 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 323,
 - (ii) CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу,
 - (iii) CM1 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 41, и
 - (iv) CP1 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 1;
- (d) дополнительно при этом:
- (i) вторая мономерная конструкция является такой же, как и первая мономерная конструкция,
 - (ii) DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc IgG4 человека;
- (e) DD1 и DD2 ковалентно связываются друг с другом через по меньшей мере одну дисульфидную связь, образуя таким образом гомодимер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и
- (f) АСС характеризуется пониженным уровнем активности интерферона альфа по сравнению с активностью интерферона альфа для пэгилированного интерферона альфа-2b.
179. АСС по п. 178, отличающаяся тем, что PM2 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичности с одной из SEQ ID NO: 323, 331, или 332.
180. АСС по п. 138, отличающаяся тем, что каждая из первой и второй мономерных конструкций содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 321, или при этом каждая из первой и второй мономерных конструкций содержит последовательность SEQ ID NO: 321, при этом АСС проявляет

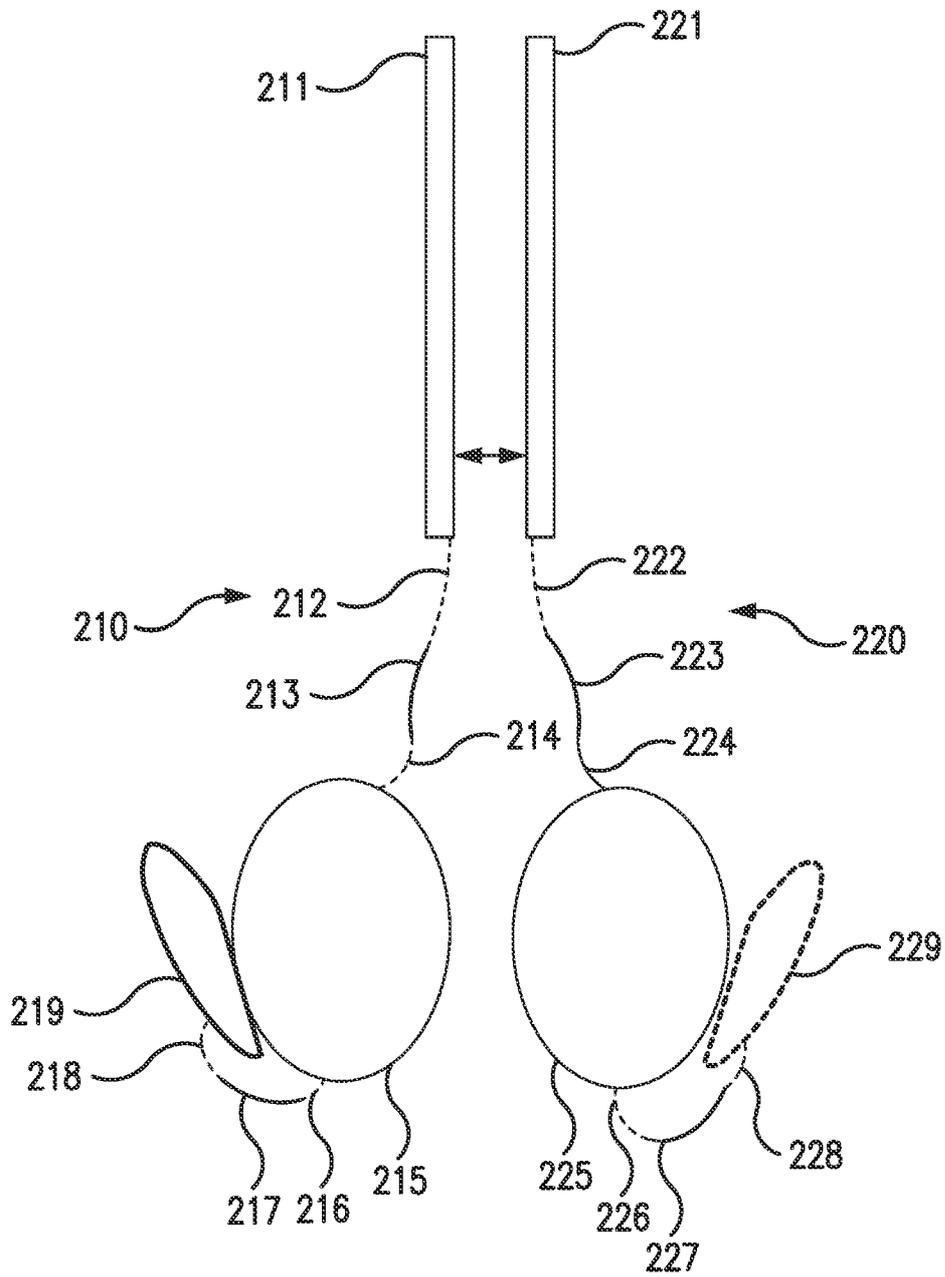
более низкую токсичность *in vivo* по сравнению либо с интерфероном альфа-2b дикого типа, либо с пэгилированным интерфероном альфа-2b.

181. Композиция, содержащая АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–180.
182. Композиция по п. 181, отличающаяся тем, что представляет собой фармацевтическую композицию.
183. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащие по меньшей мере одну дозу композиции по п. 181 или п. 182.
184. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–179 или композиции по п. 181 или п. 182.
185. Способ по п. 184, отличающийся тем, что у субъекта идентифицировано или диагностировано злокачественное новообразование.
186. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит первый мономер АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–179.
187. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 186.
188. Вектор по п. 187, отличающийся тем, что представляет собой вектор экспрессии.
189. Клетка млекопитающего, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 186 или вектор по п. 187 или п. 188.
190. Клетка млекопитающего по п. 189, отличающаяся тем, что представляет собой клетку НЕК293 или клетку СНО.
191. Способ производства АСС, включающий:
экспрессию АСС в клетке млекопитающего по п. 189 или п. 190; и
очистку экспрессированной АСС.

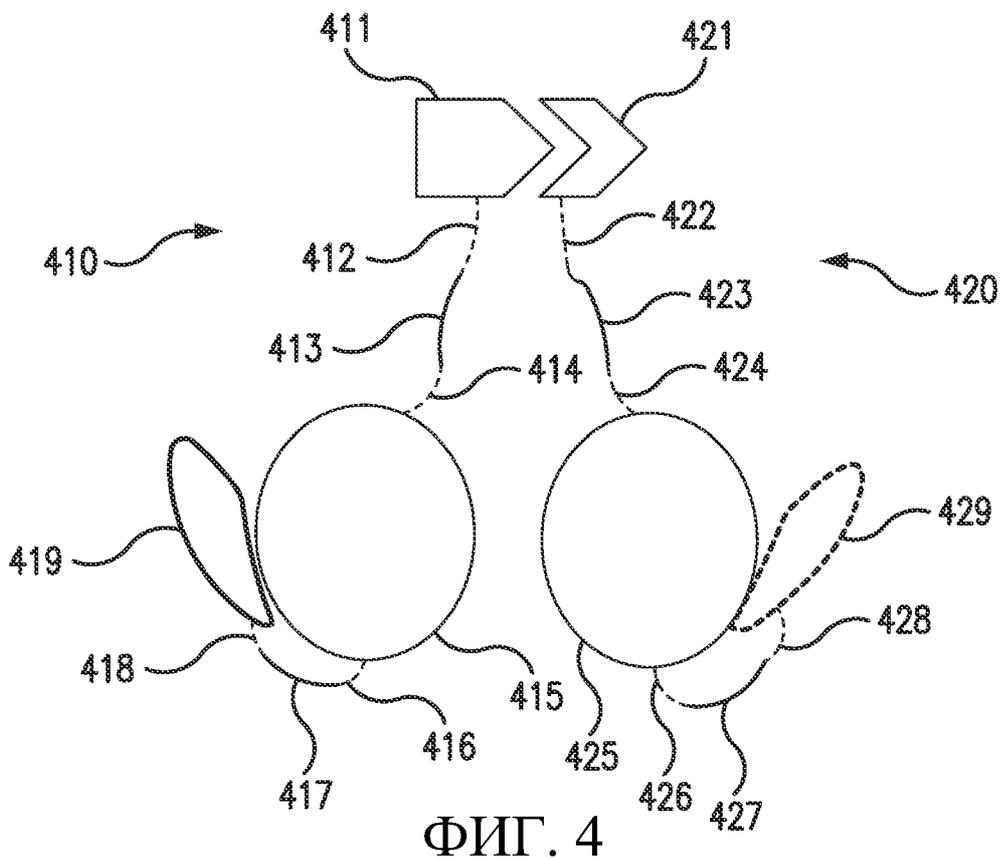
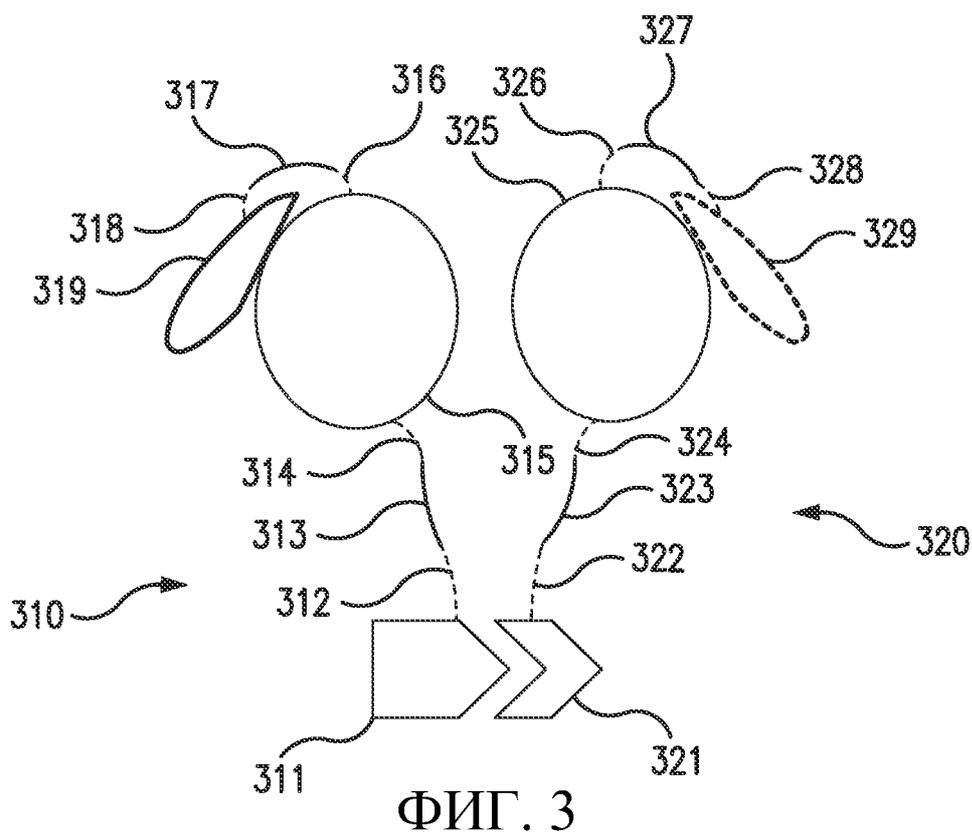
192. АСС по любому одному или комбинации из пп. 138–180, отличающаяся тем, что каждый из СМ1 и СМ3 функционирует в качестве субстрата для протеазы, которая сверхэкспрессируется в опухолевой ткани.

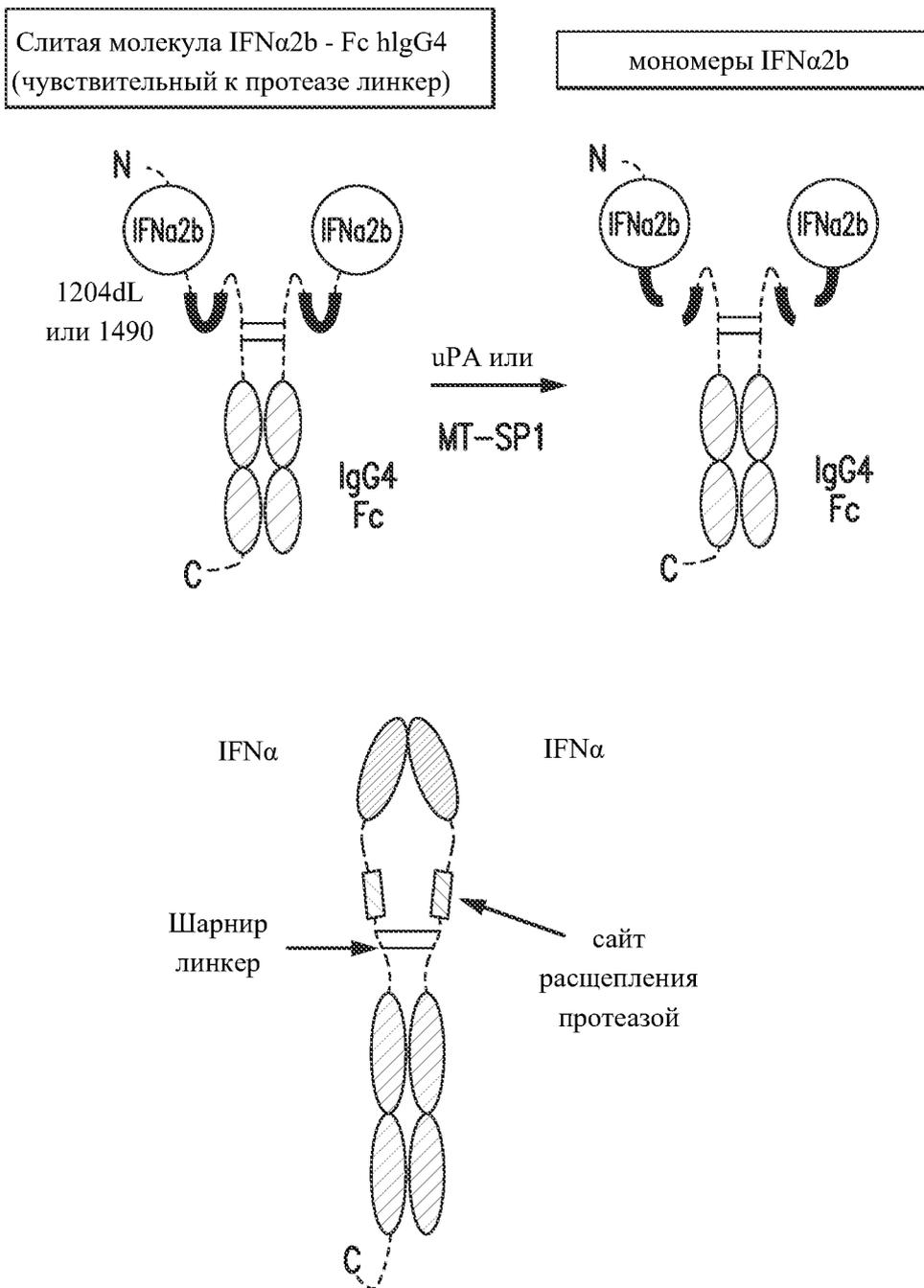


ФИГ. 1

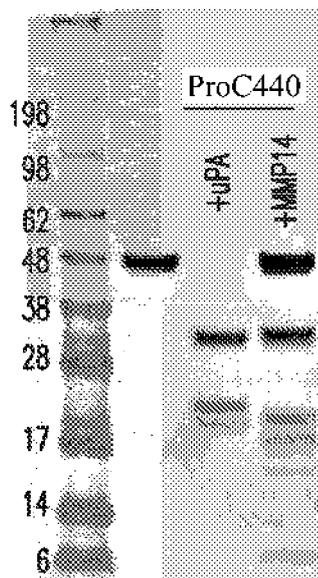


ФИГ. 2



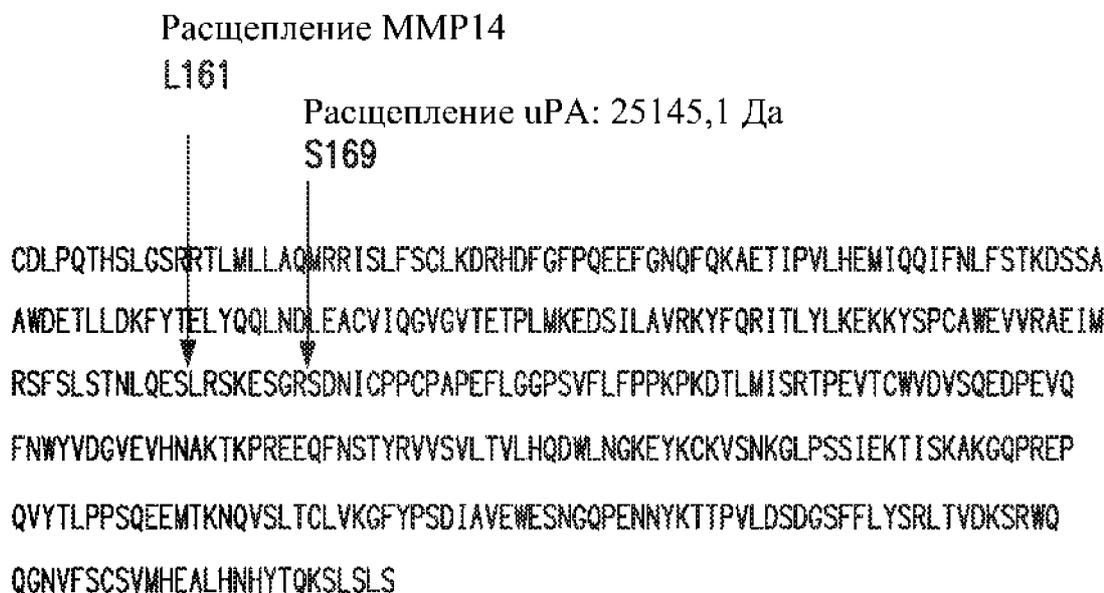


ФИГ. 5

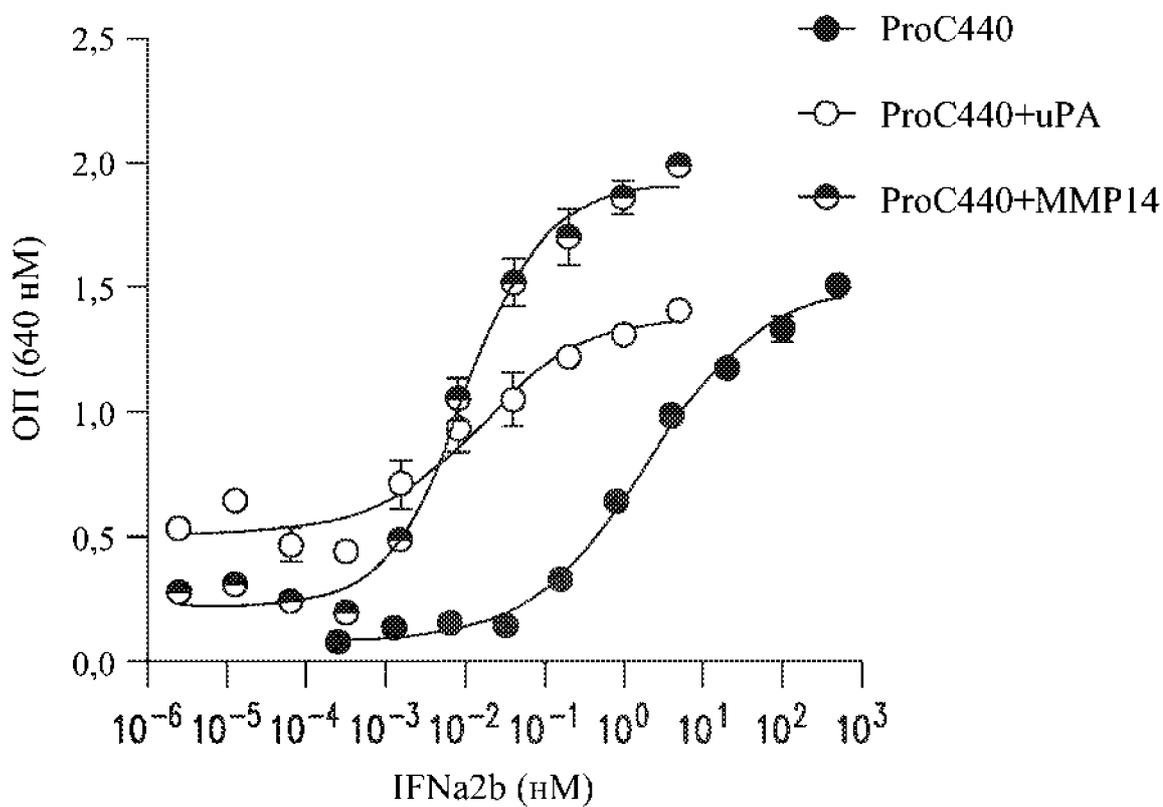


ФИГ. 6А

Данные ЖХ/МС ProC440:

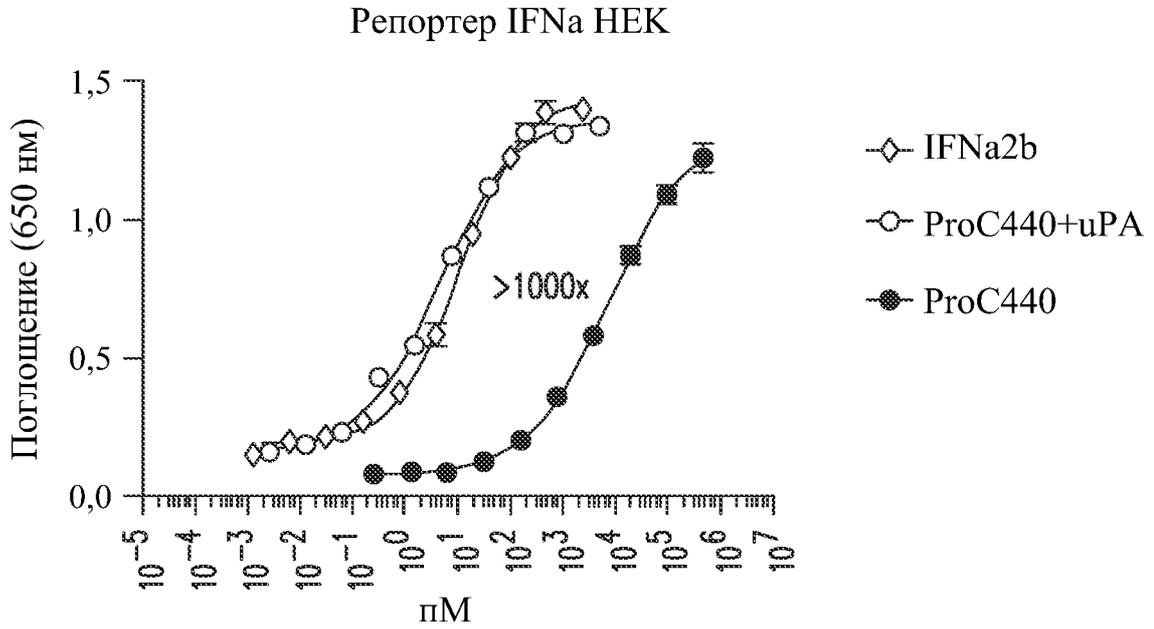


ФИГ. 6В

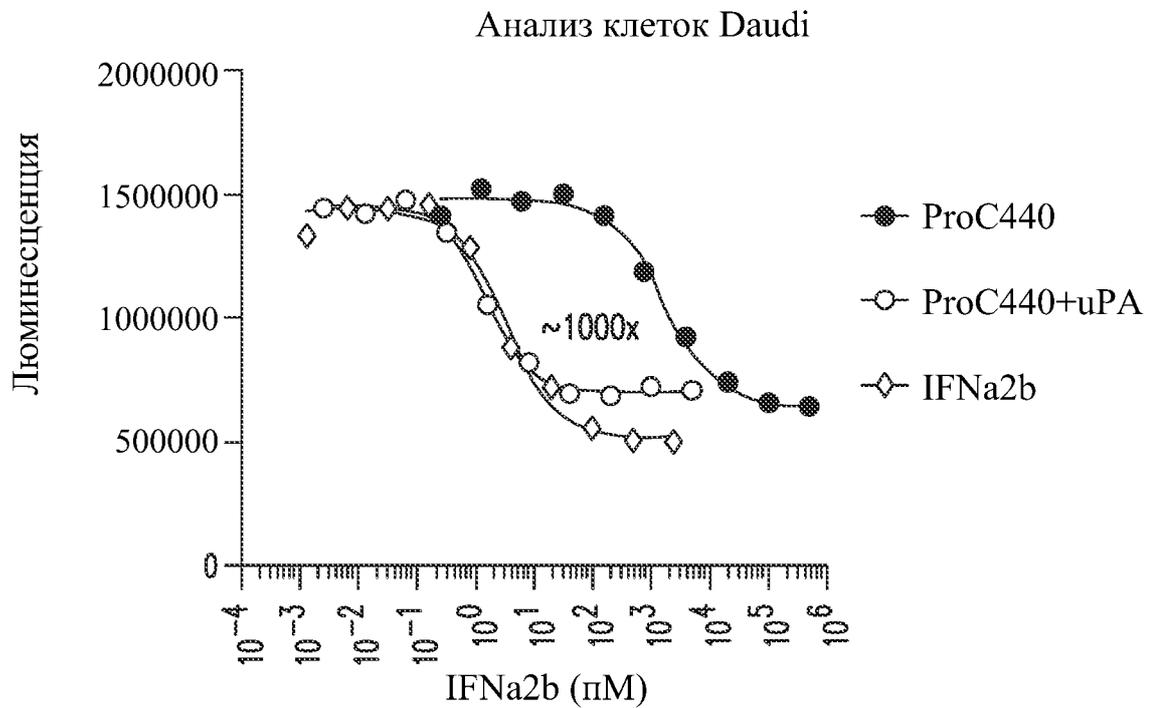


	ProC440	ProC440+uPA	ProC440+MMP14
EC50	1,861	0,01503	0,009833

ФИГ. 6С



ФИГ. 7А



ФИГ. 7В

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

QSGQTDVDYREWSWTQVSGSSGGSLSGRSDNIGSGGSCDLPQTHSLG
SRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE
MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQQLNDLEACVIQGVGVT
ETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSL
TNLQESLRSKELSGRSDNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDMLMIS
RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
LPDSQEEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVL
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGQNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS

(ProC732)

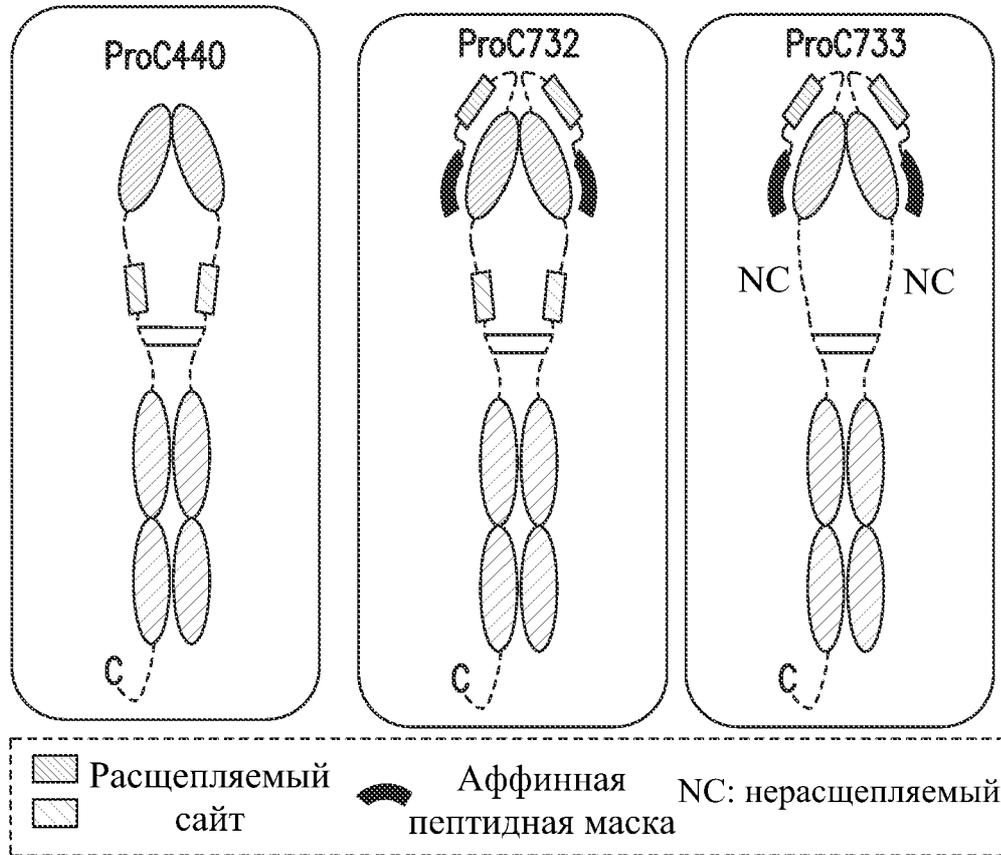
ФИГ. 8

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

QSGQTDVDYYREWSWTQVSGSSGGSLSGRSDNIGSGGSCDLPQTHSLG
SRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE
MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETL LDKFYTELYQQ LNDLEACVIQGVGVT
ETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSL
TNLQESLRSKEESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS

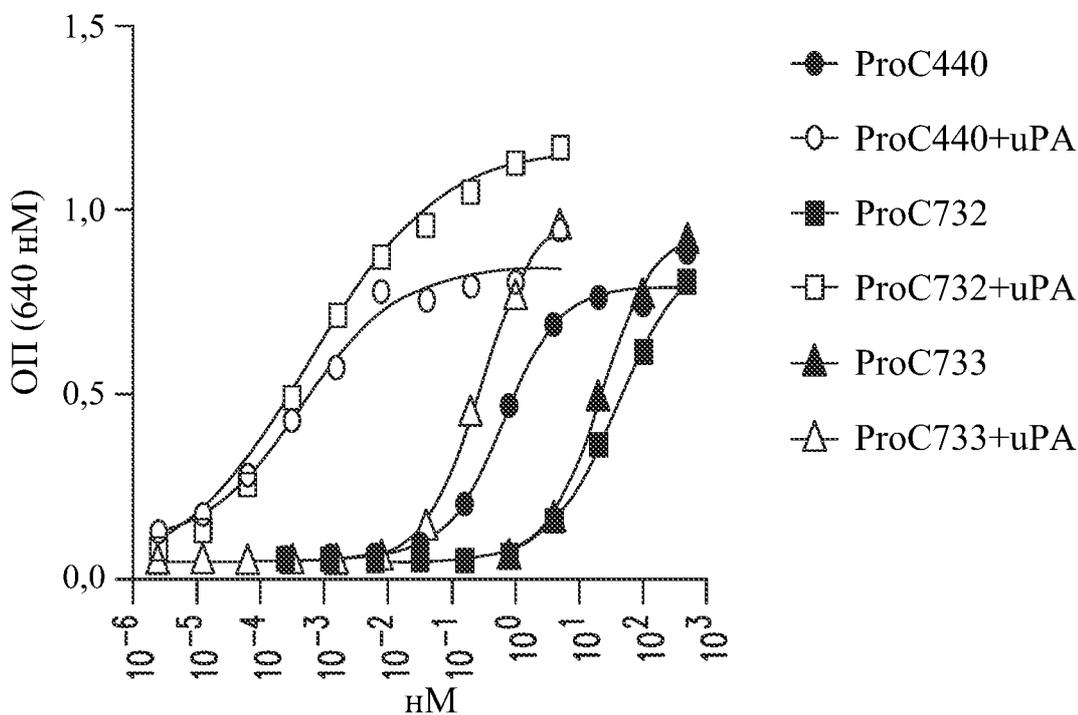
(ProC733)

ФИГ. 9



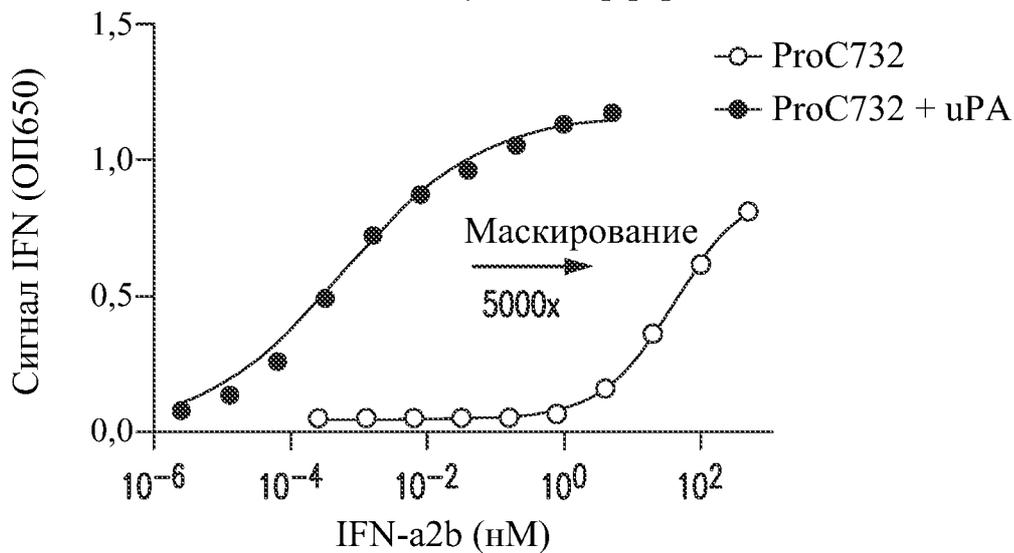
ФИГ. 10А

Репортерный анализ НЕК

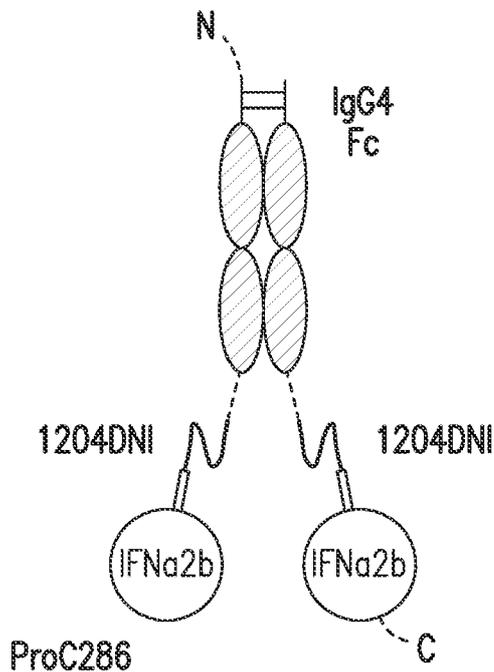


ФИГ. 10В

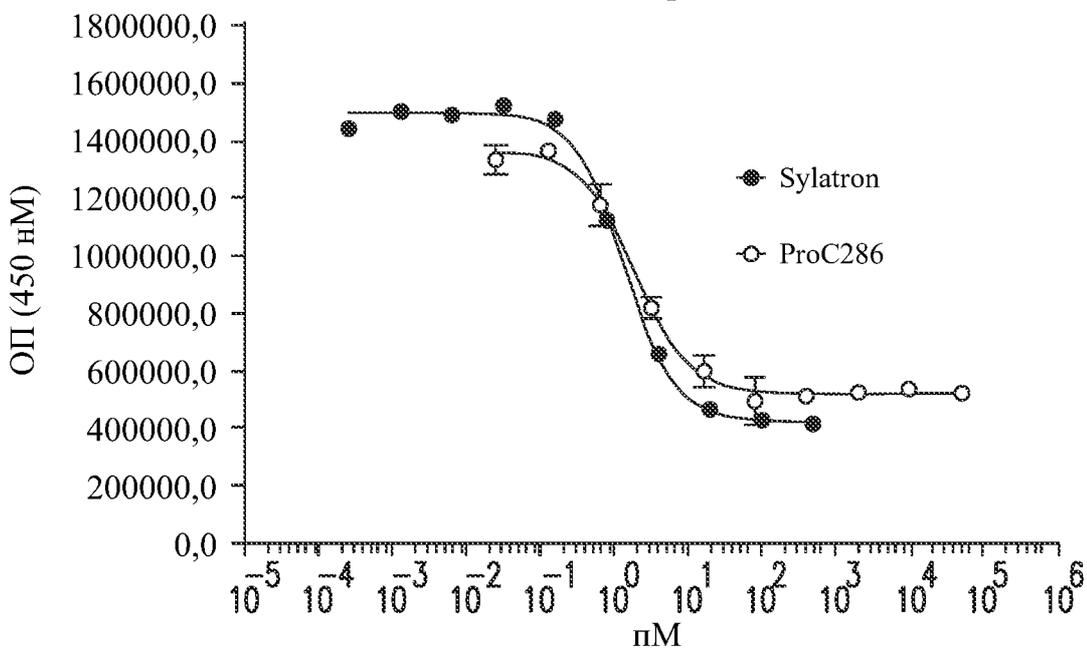
Активация пути интерферона



ФИГ. 10С

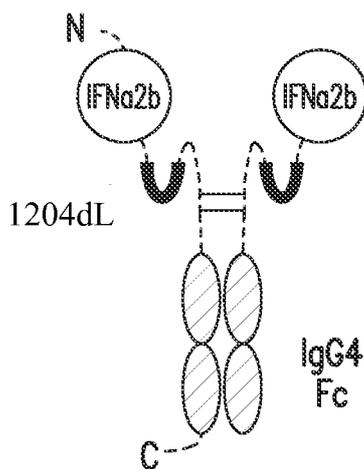
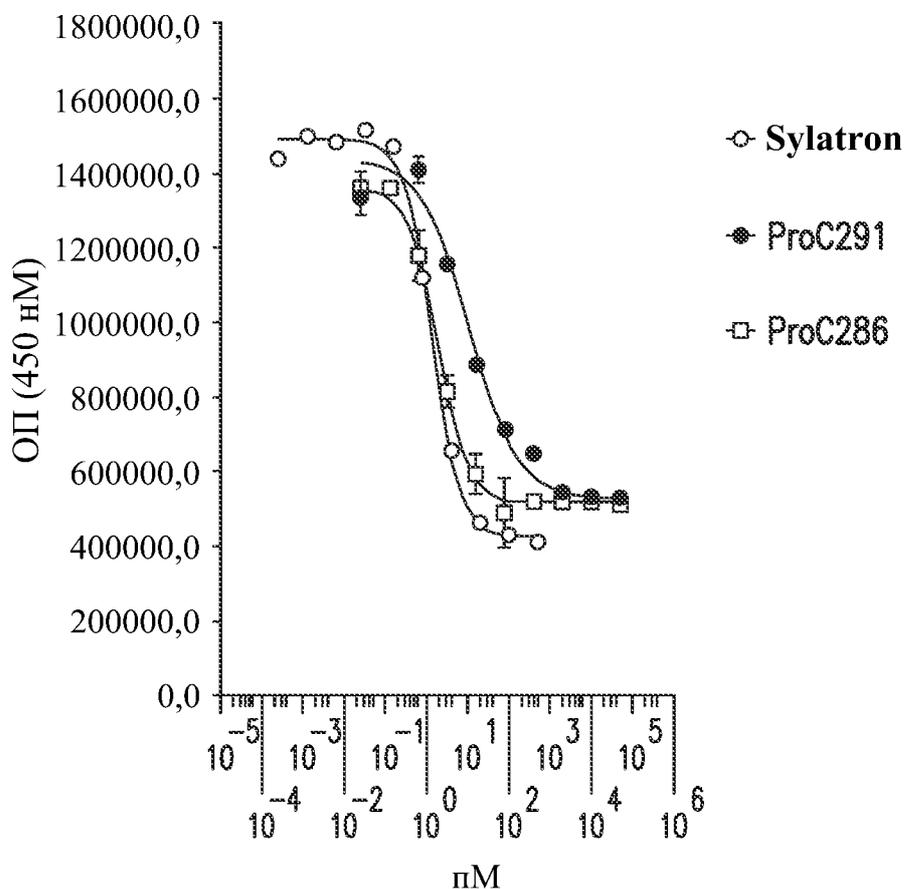


АТР: Клетки Daudi + IFNα2b,
 3-дневная обработка



ФИГ. 11А

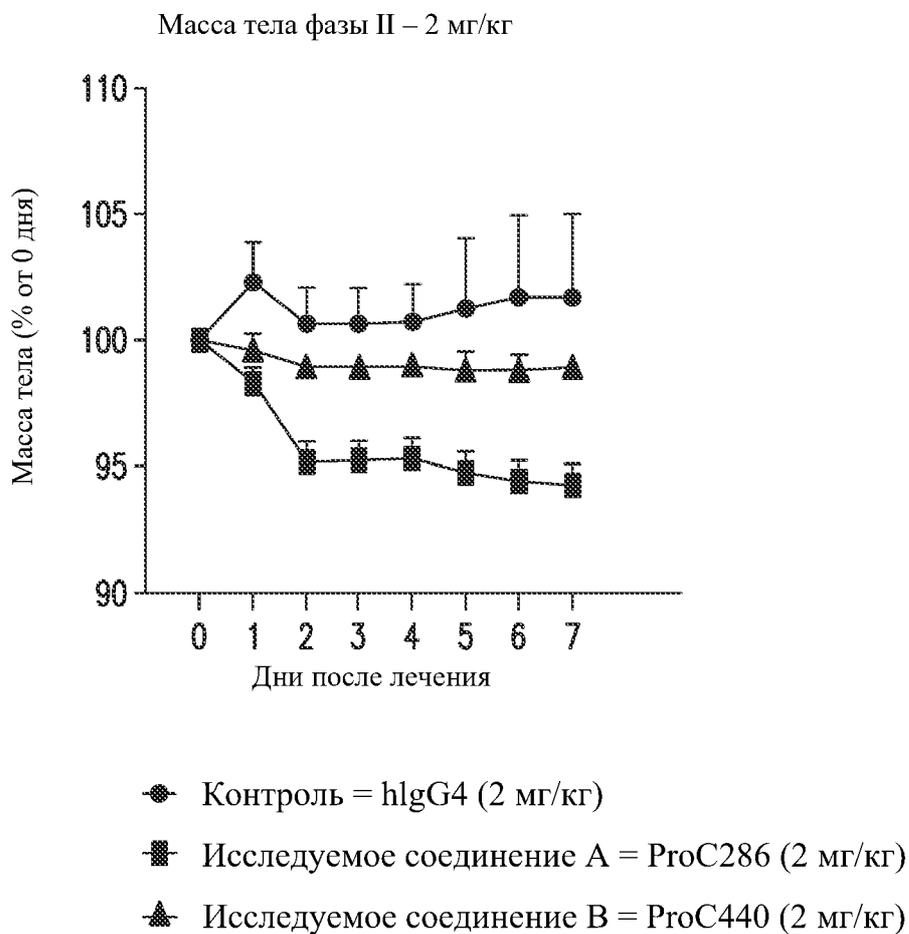
Анализ пролиферации Daudi



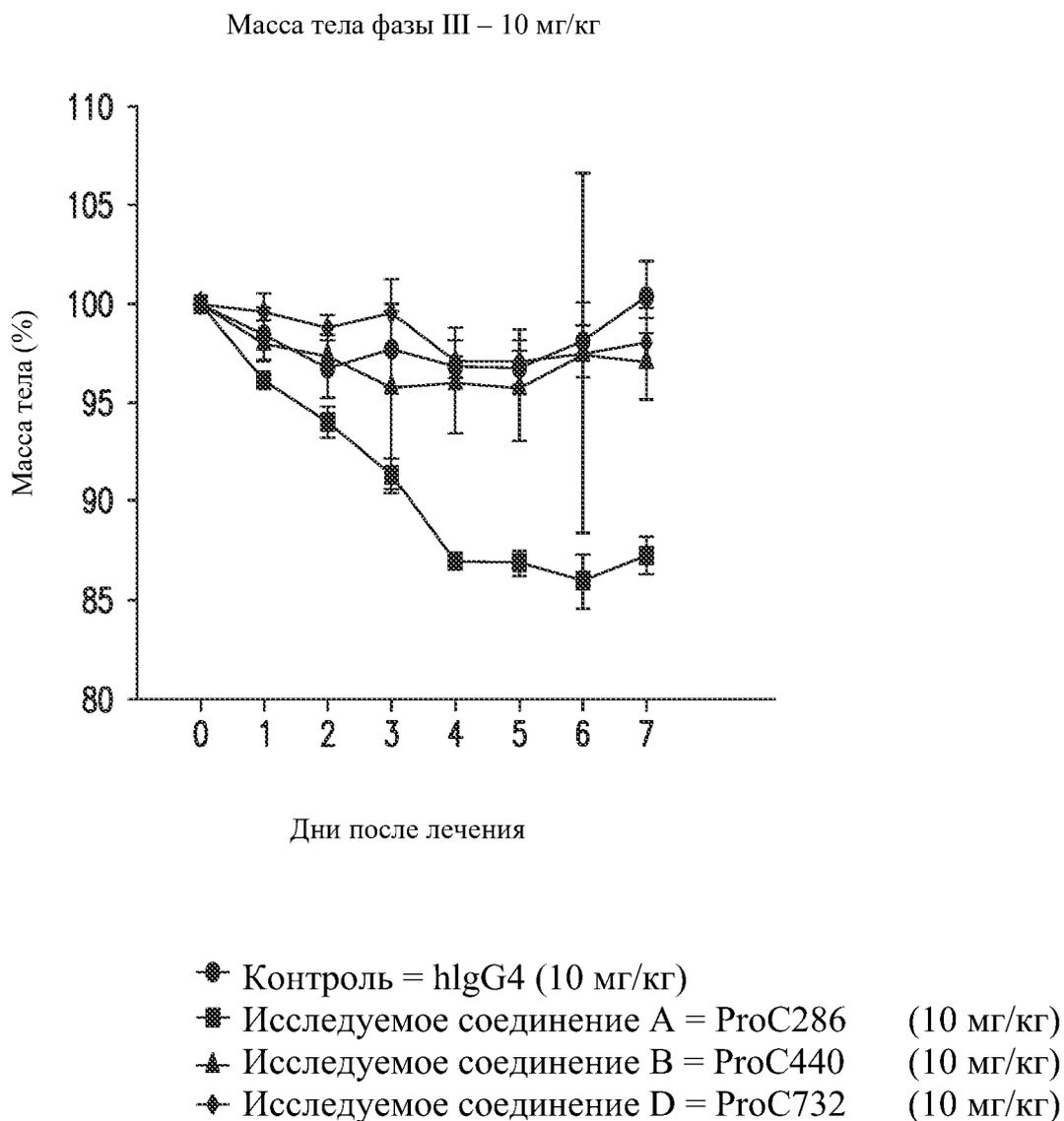
ФИГ. 11В

	IFNa-con	ProC440+uPA	PEG-IFNa2b (Sylatron)	ProC440
Удельная активность	$1-2 \times 10^9$ Ед/мг	$3,5 \times 10^8$ Ед/мг	$0,7 \times 10^8$ Ед/мг	$1,3 \times 10^7$ Ед/мг
Предполагаемая токсическая доза	0,1 мг/кг *	0,288 мг/кг	1,43 мг/кг	7,68 мг/кг

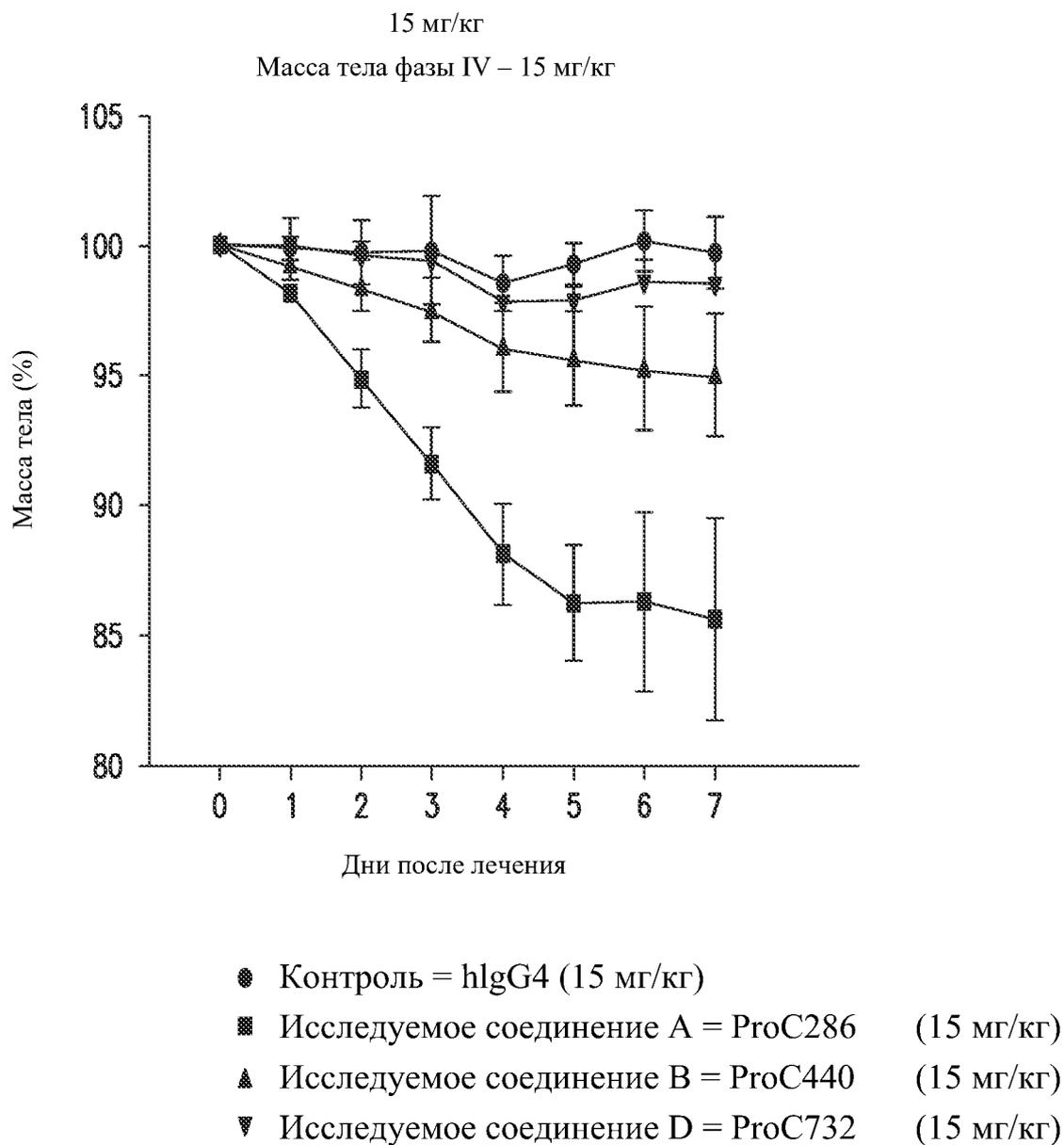
ФИГ. 12



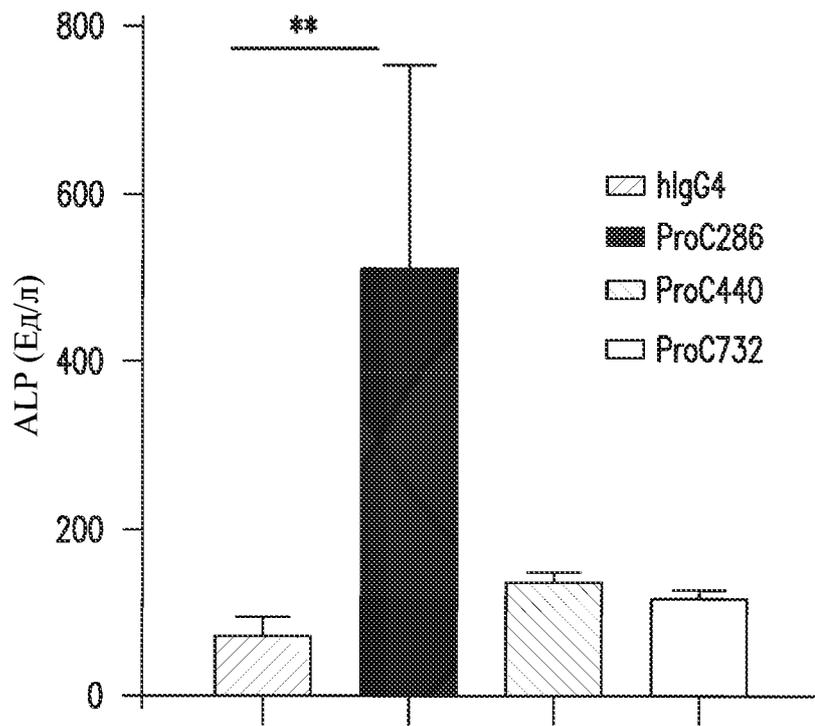
ФИГ. 13А



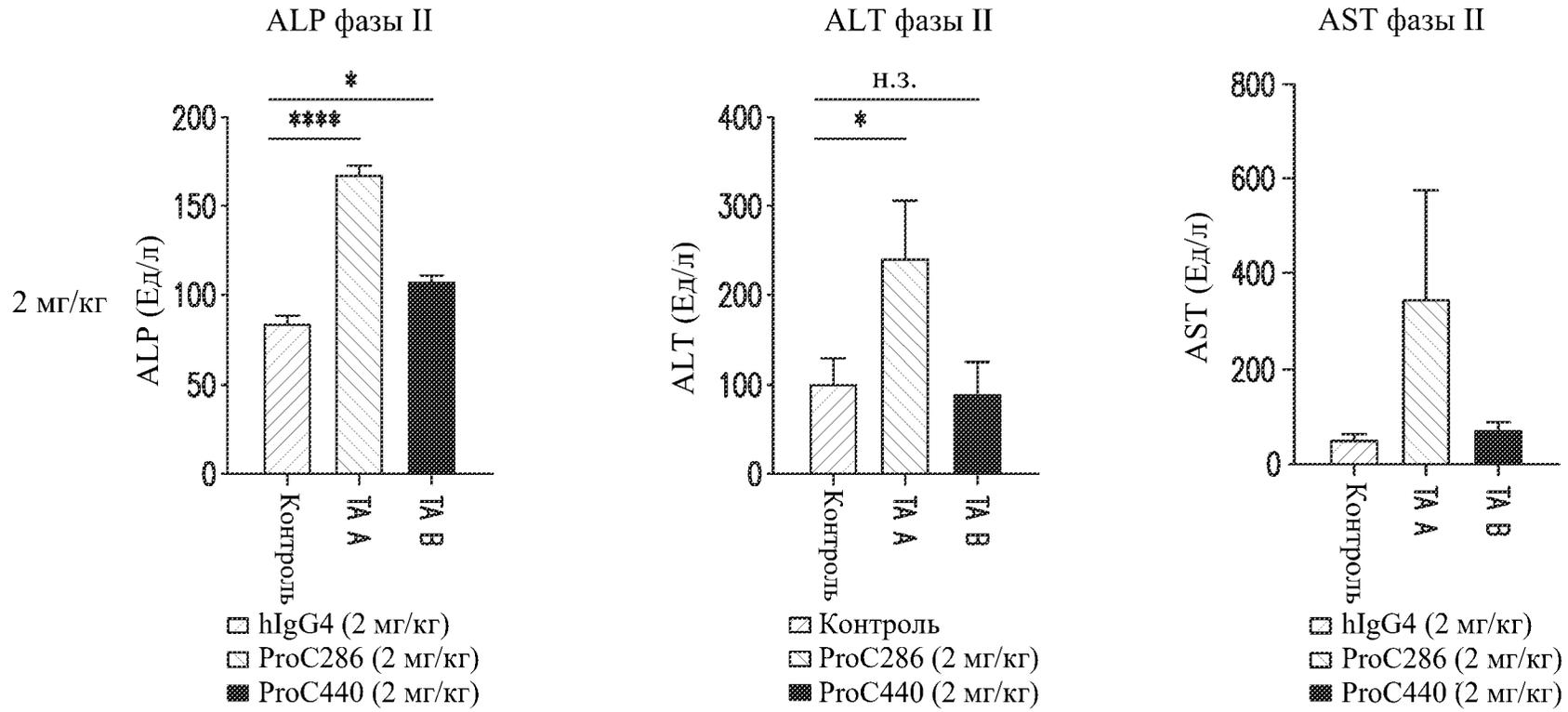
ФИГ. 13В



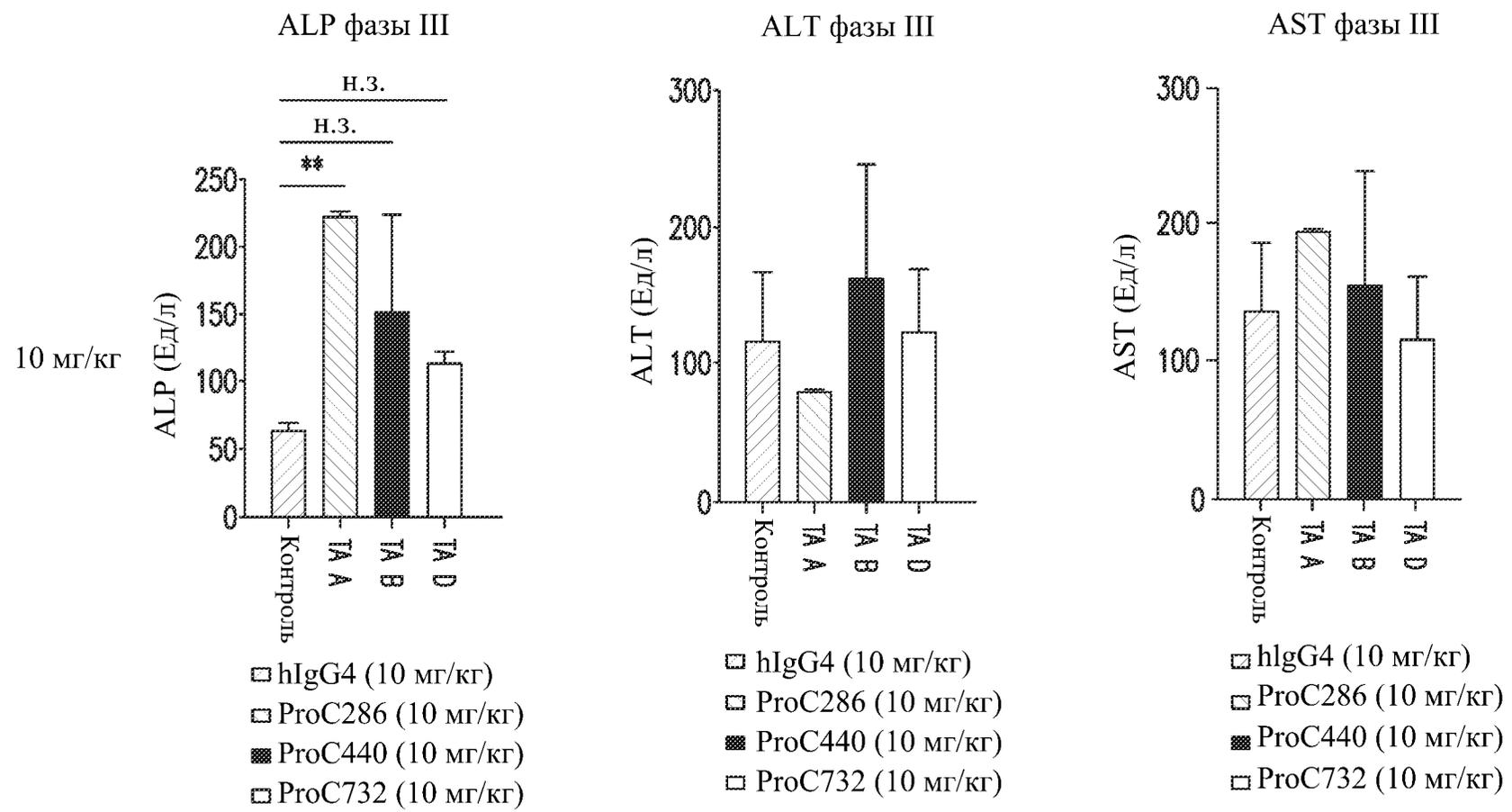
ФИГ. 13С



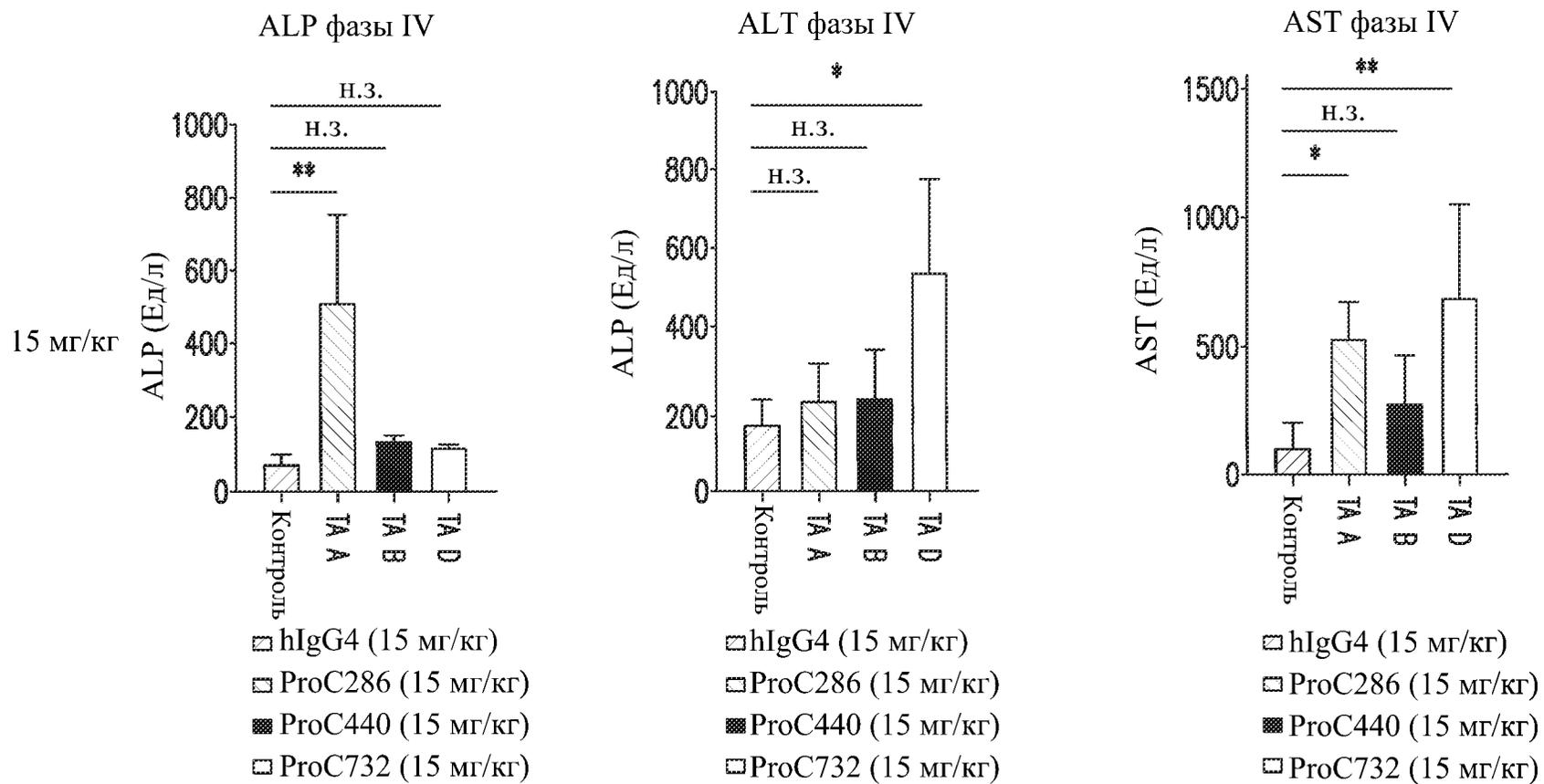
ФИГ. 13D



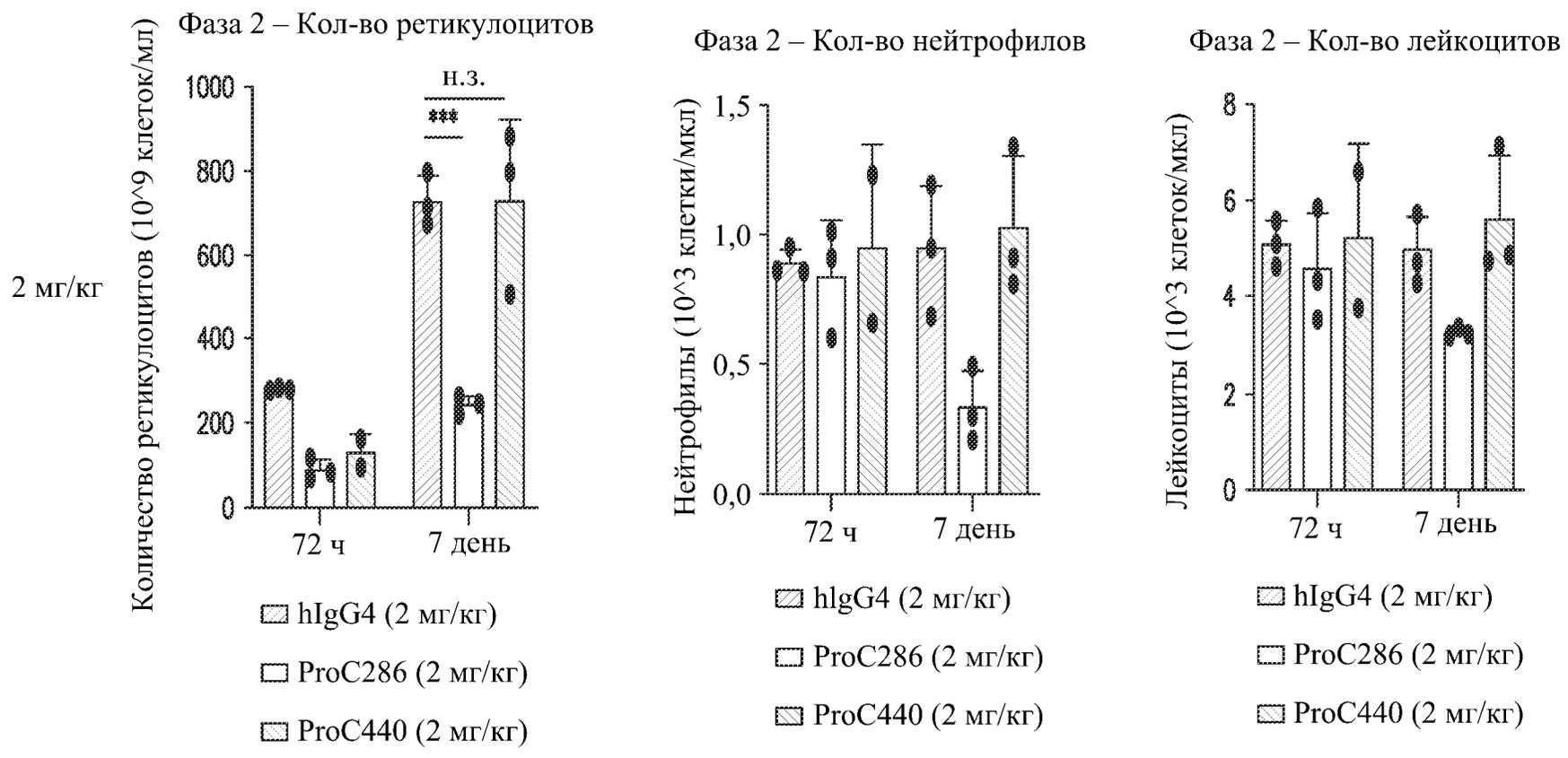
ФИГ. 14



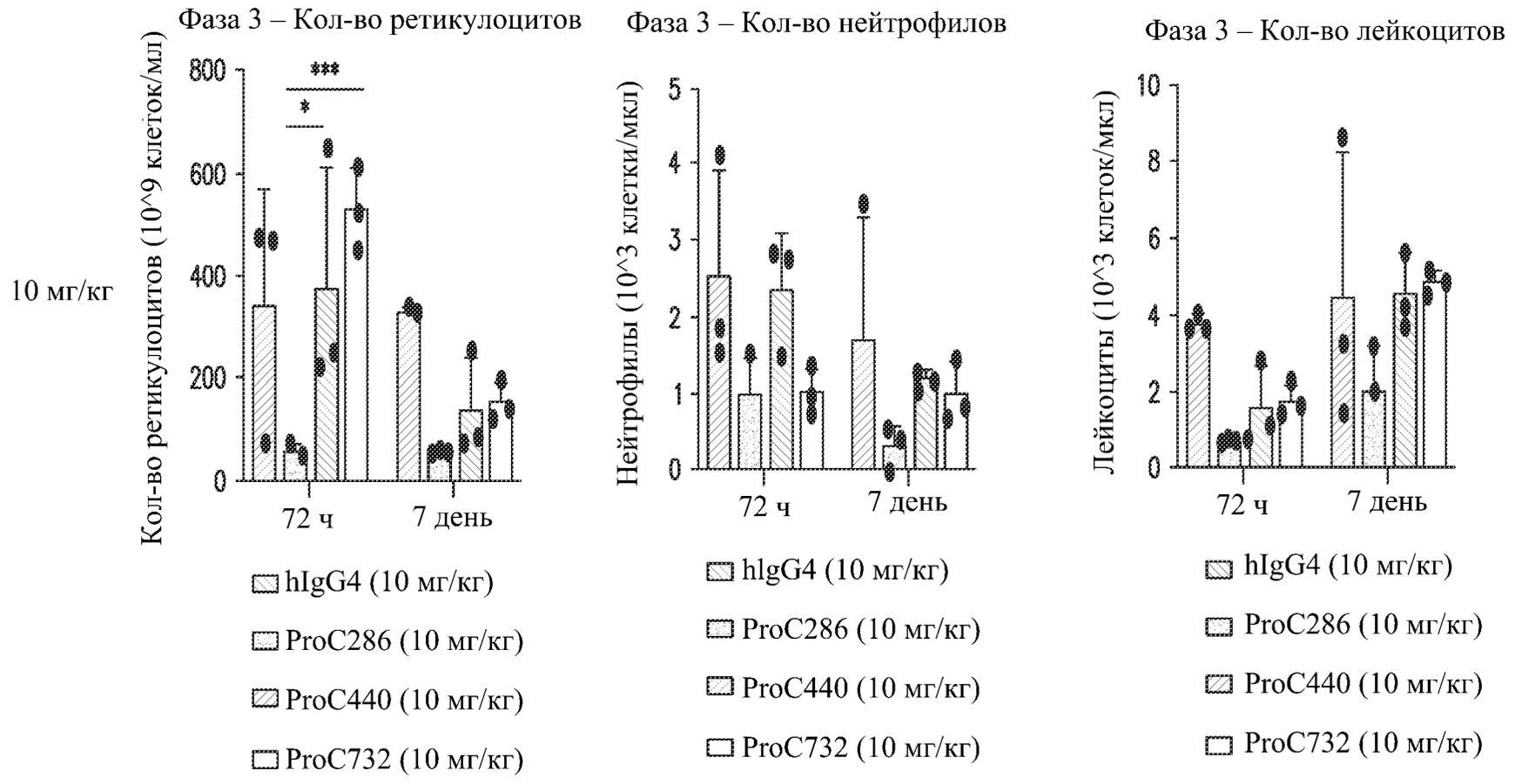
ФИГ. 14 (продолжение)



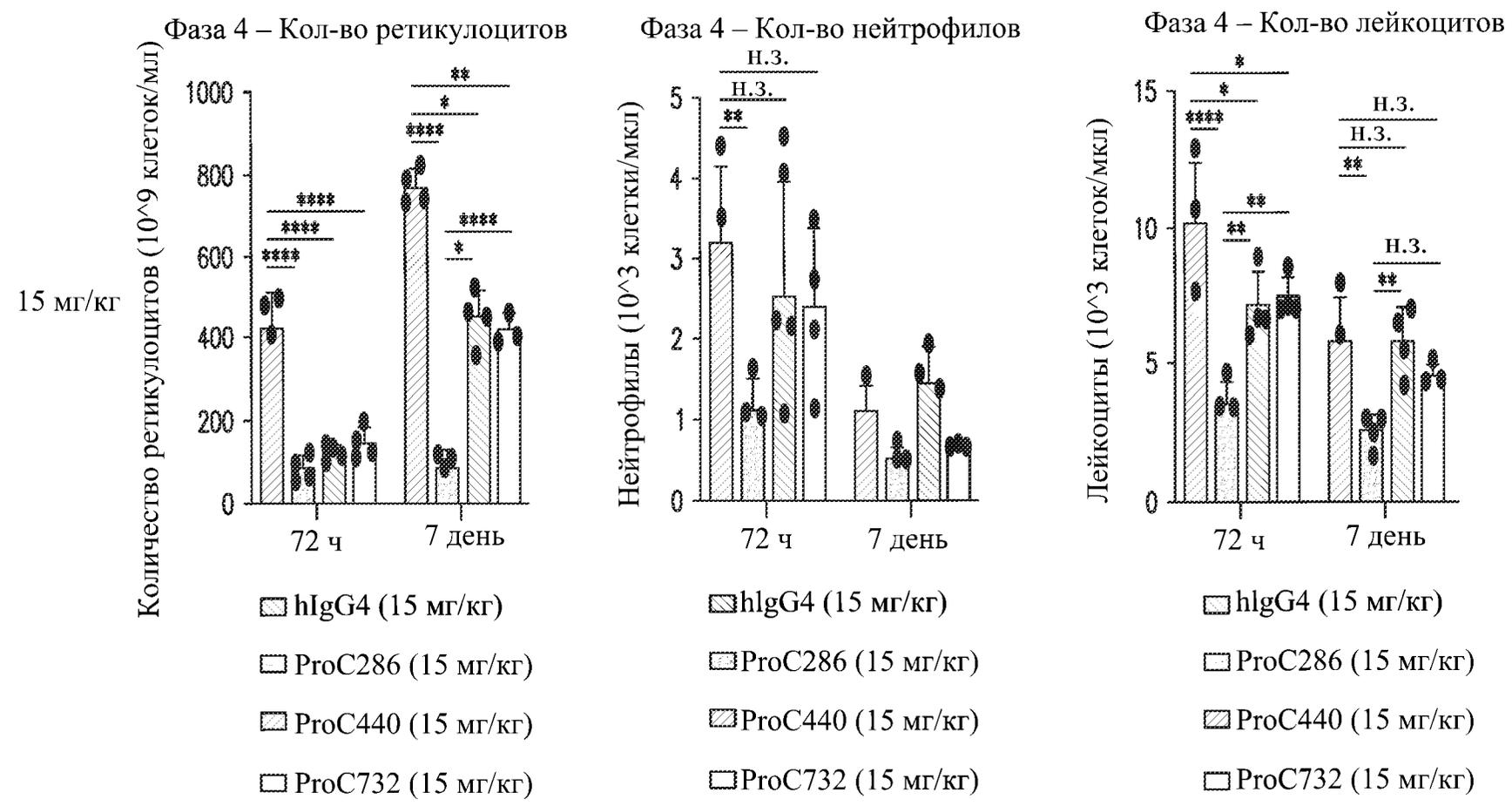
ФИГ. 14 (продолжение)



ФИГ. 15

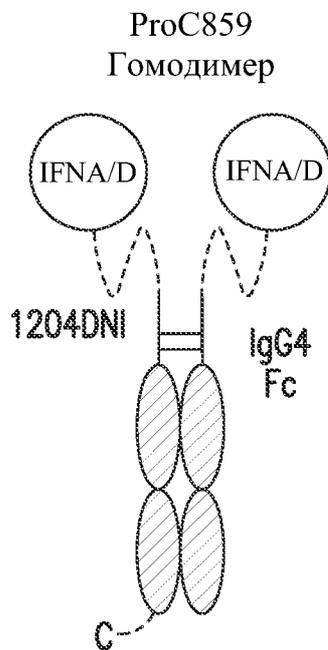
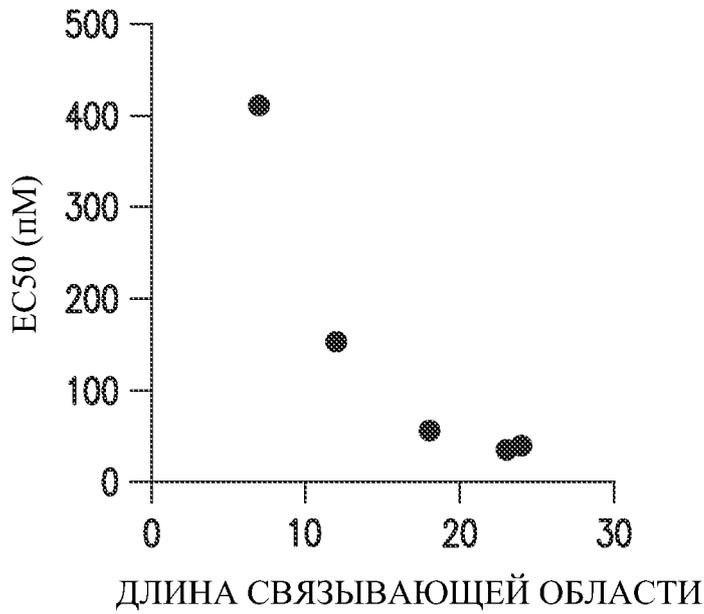


ФИГ. 15 (продолжение)



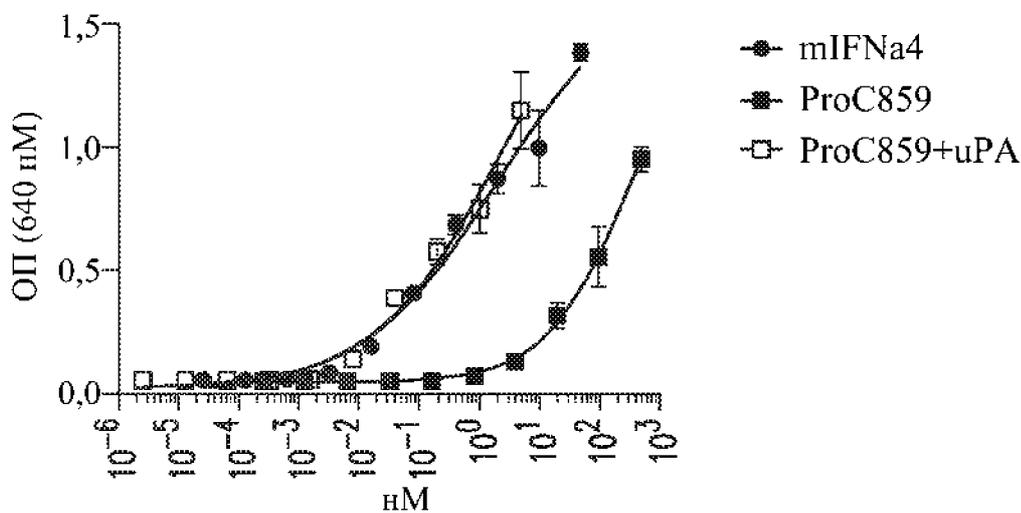
ФИГ. 15 (продолжение)

Цитоксичность в отношении Daudi,
EC50 Слитые молекулы IFNa2b-hlgG4



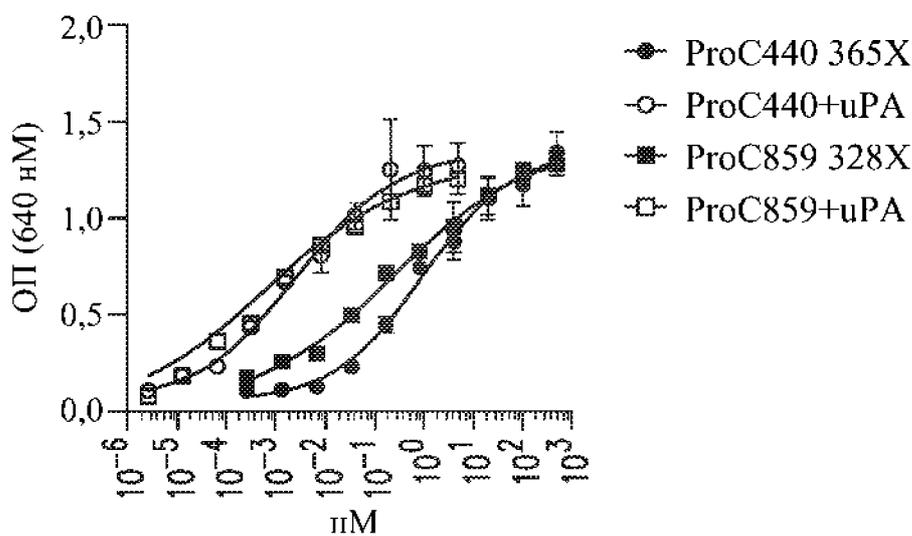
ФИГ. 16

Репортерный анализ IFN α B16



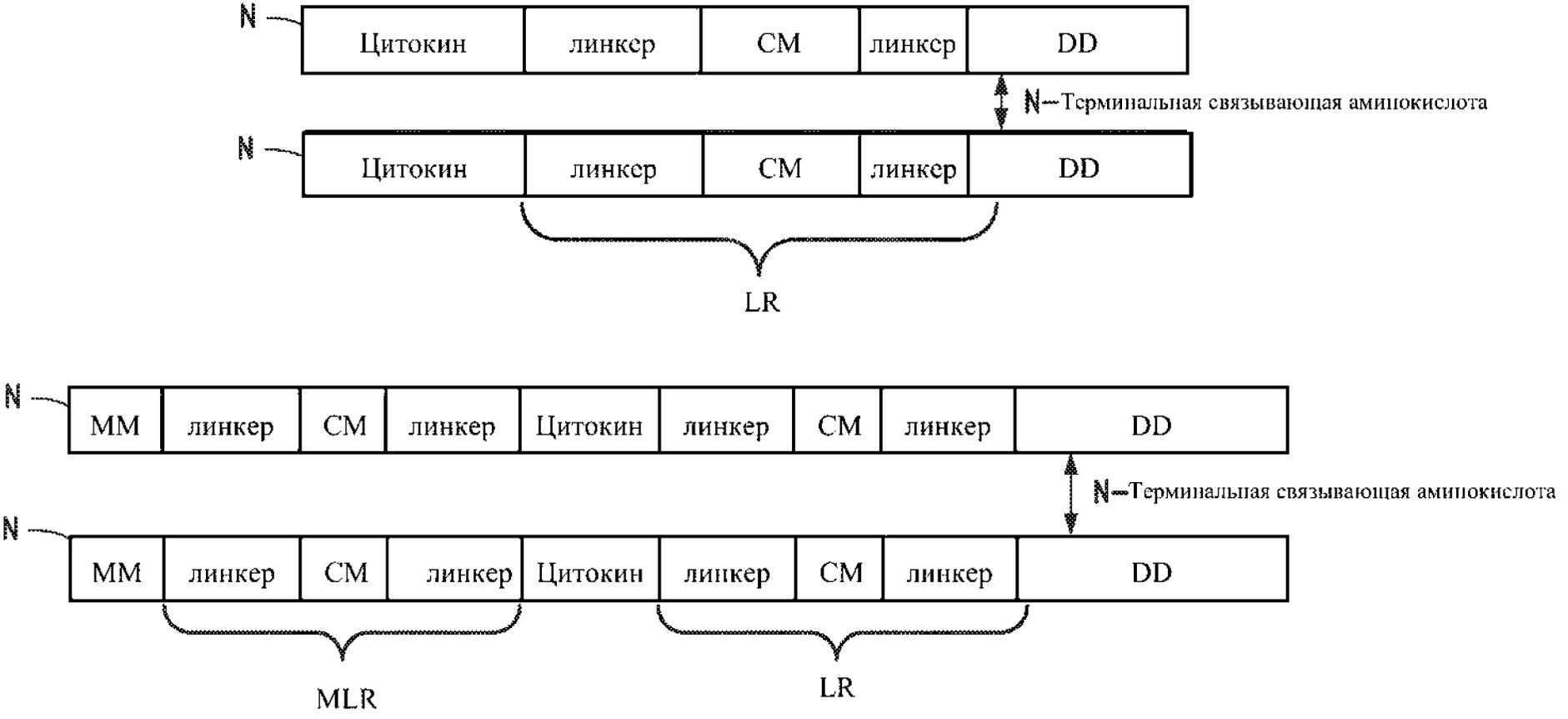
	mIFN α 4	ProC859	ProC859+uPA
EC50	1,966	293,7	1,951

НЕК:IFN α 2b и слитая молекула IFN α AD

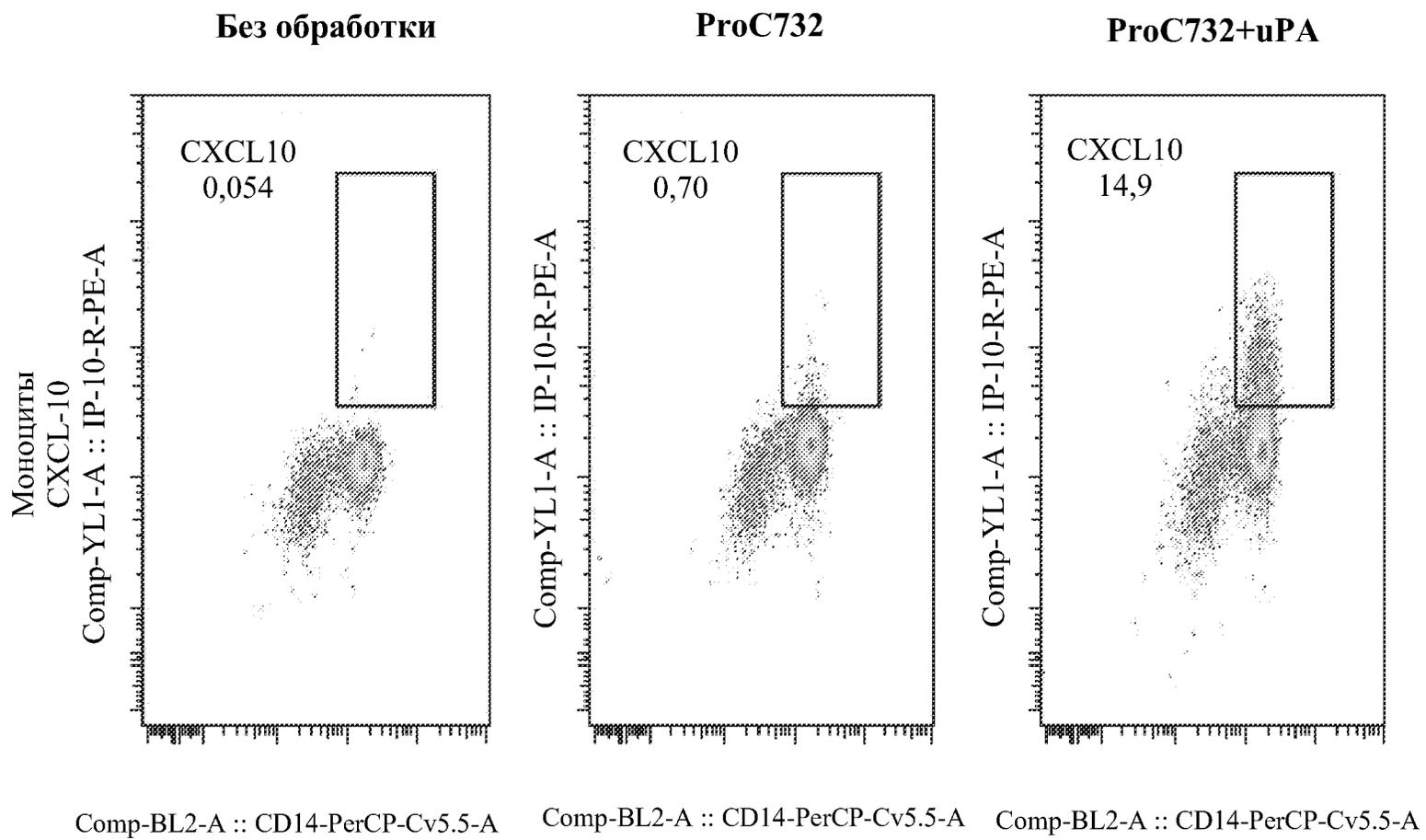


	ProC440	ProC440+uPA	ProC859	ProC859+uPA
EC50	0,9502	0,002580	0,2321	0,0006991

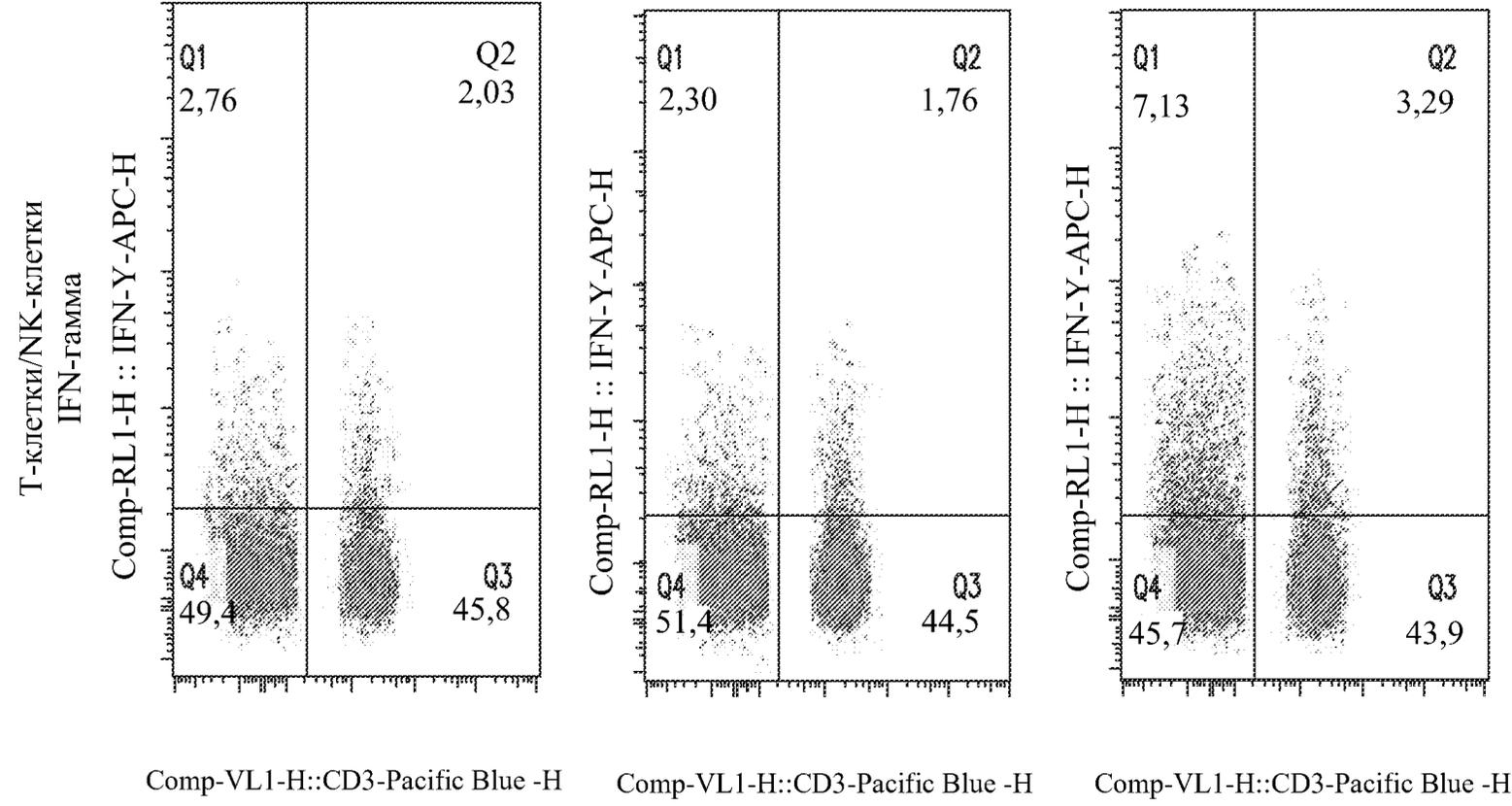
ФИГ. 17



ФИГ. 18

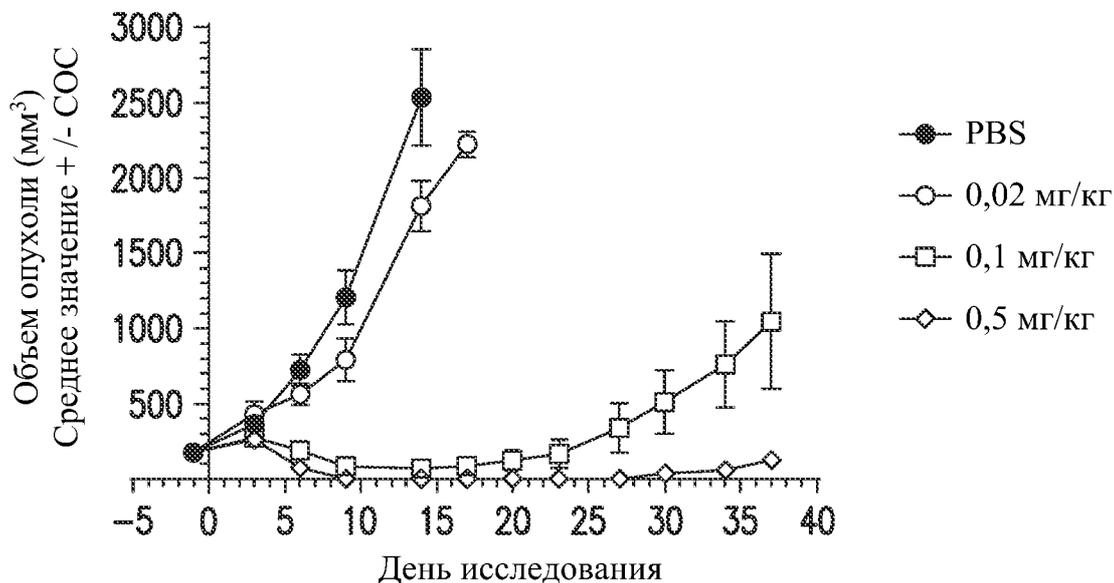


ФИГ. 19



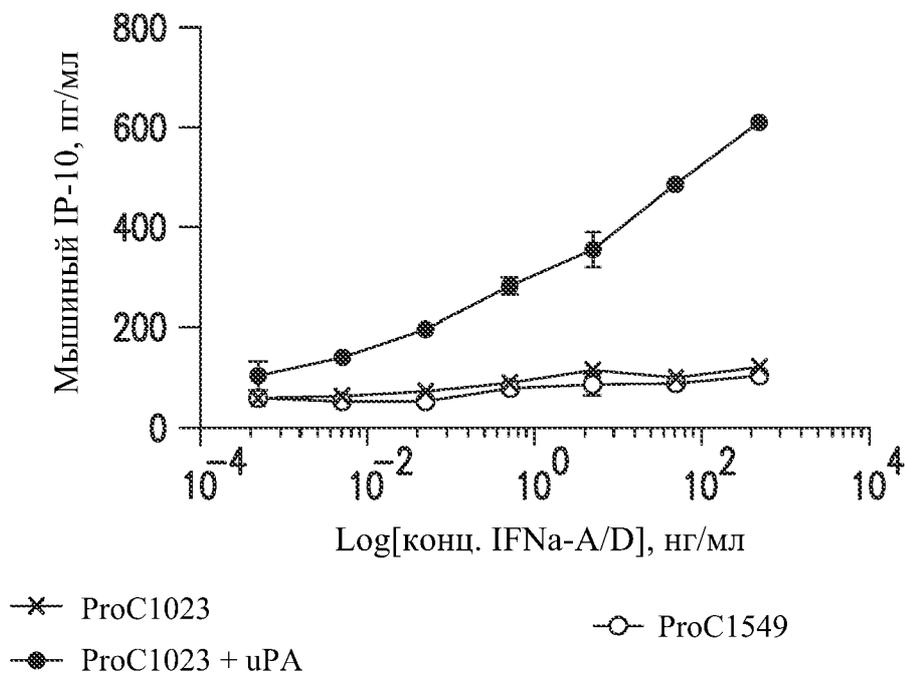
ФИГ. 19 (продолжение)

Подавление роста опухоли

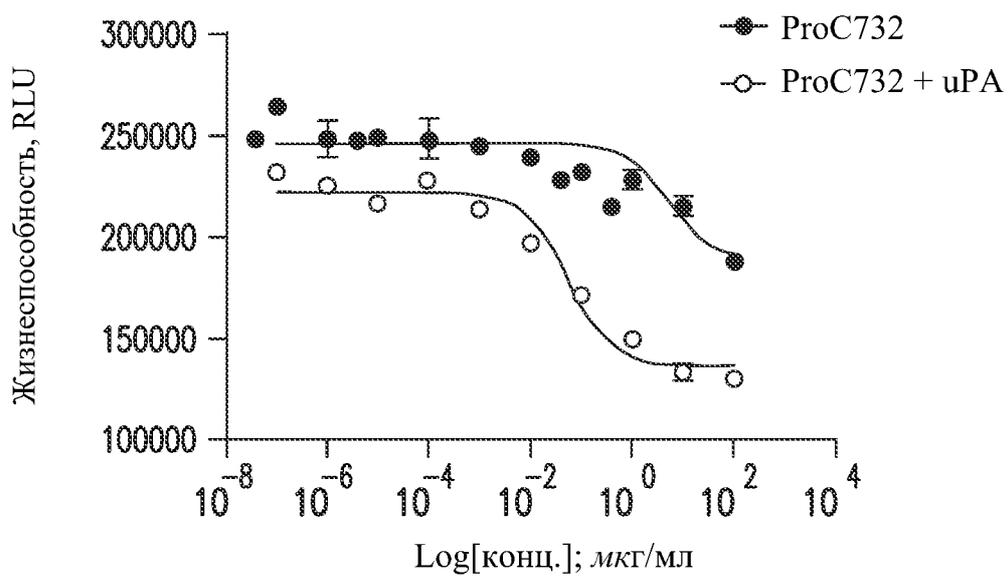


ФИГ. 20

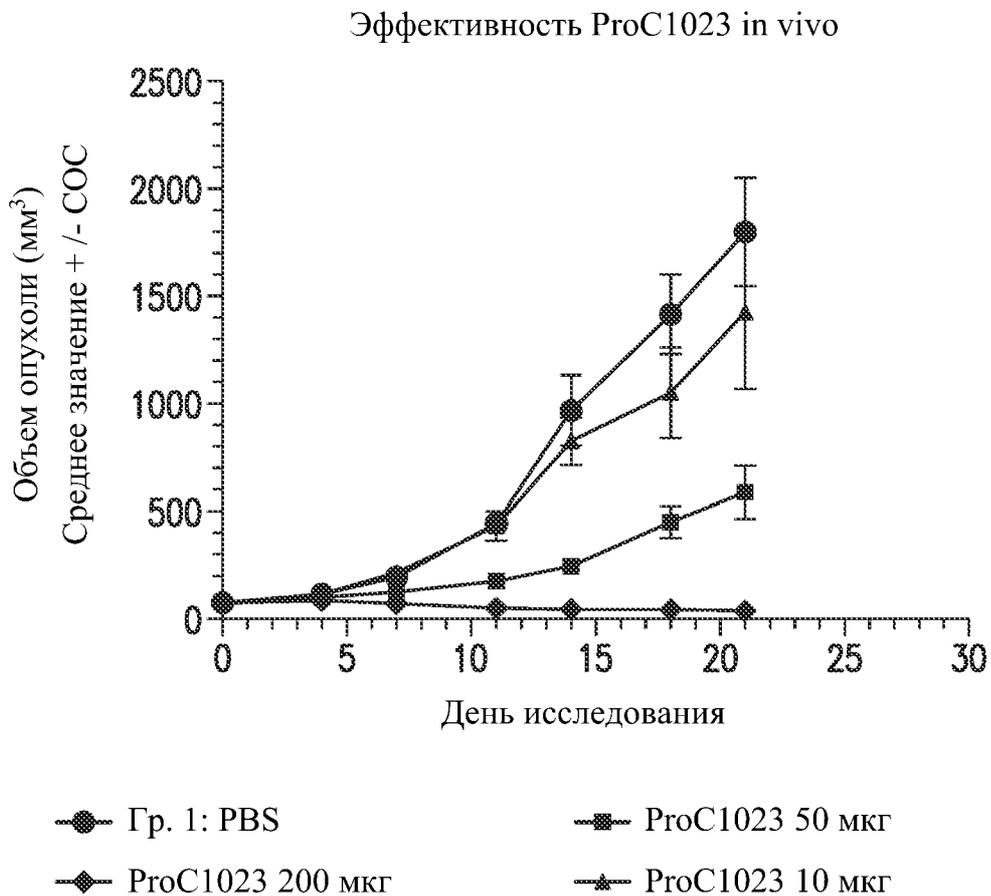
Активация in vitro спленоцитов мыши с помощью IFNa-A/D



ФИГ. 21

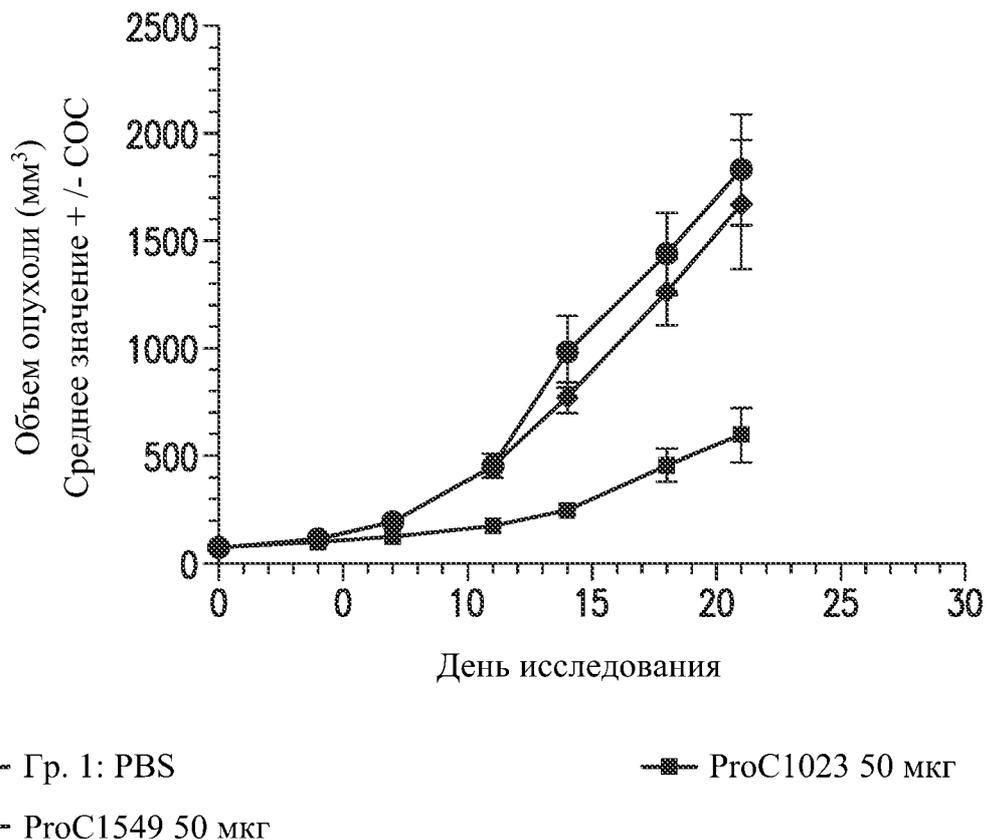


ФИГ. 22

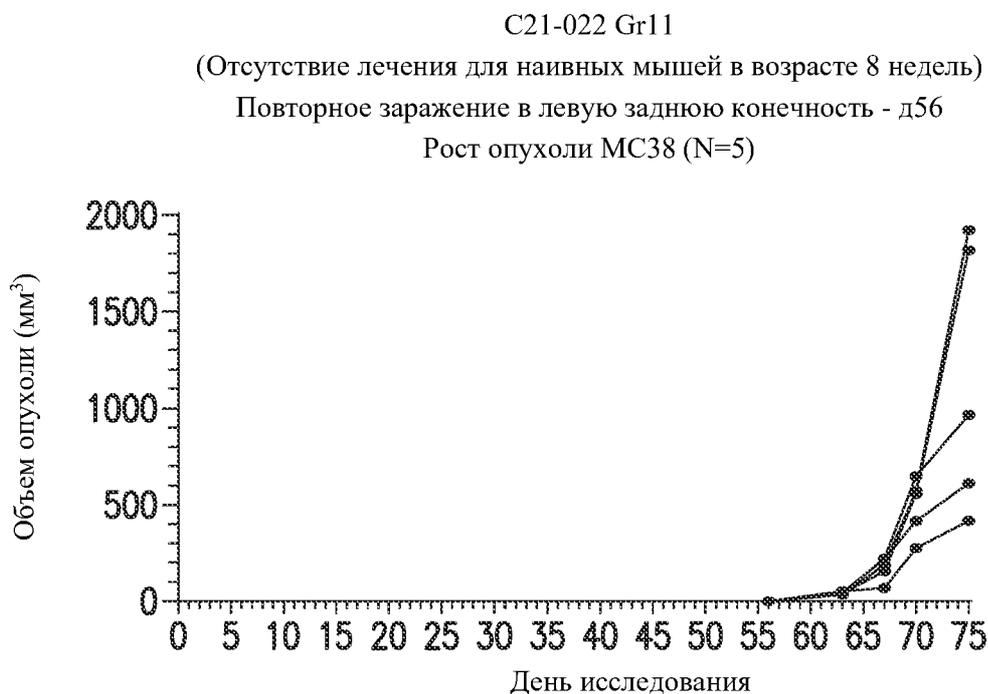


ФИГ. 23А

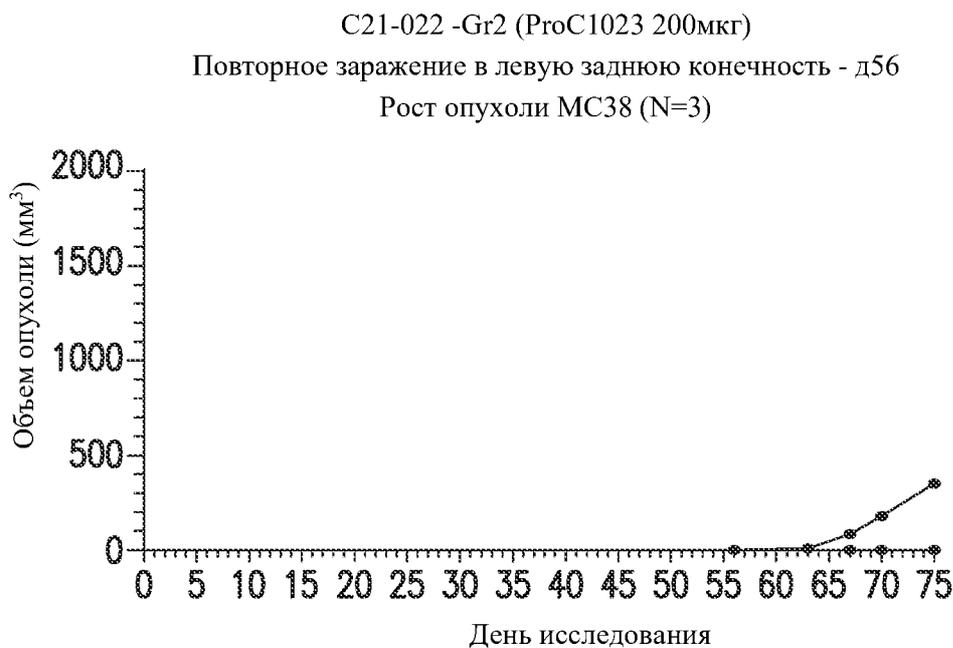
Активация ProC1023 in vivo



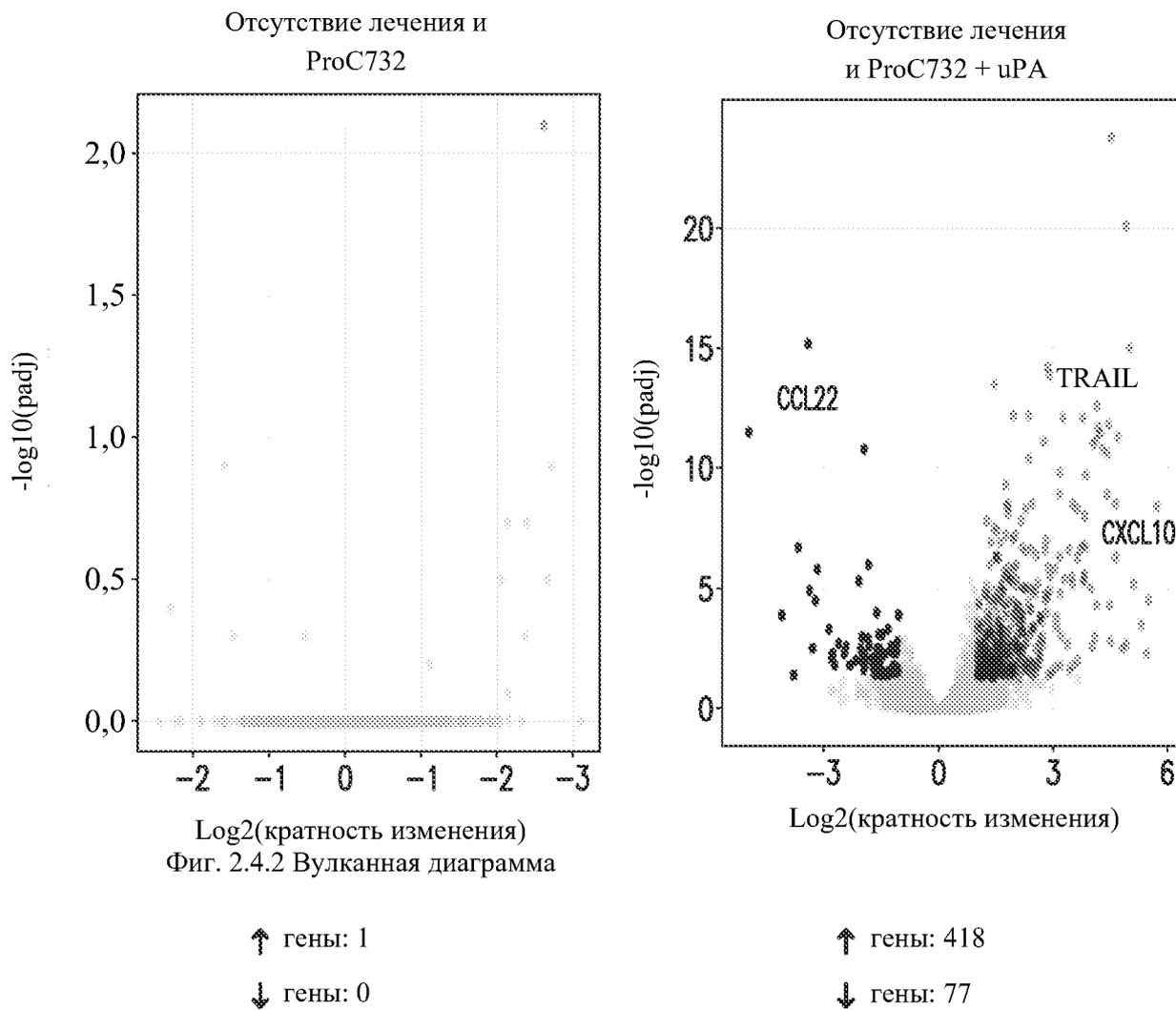
ФИГ. 23В



ФИГ. 24А

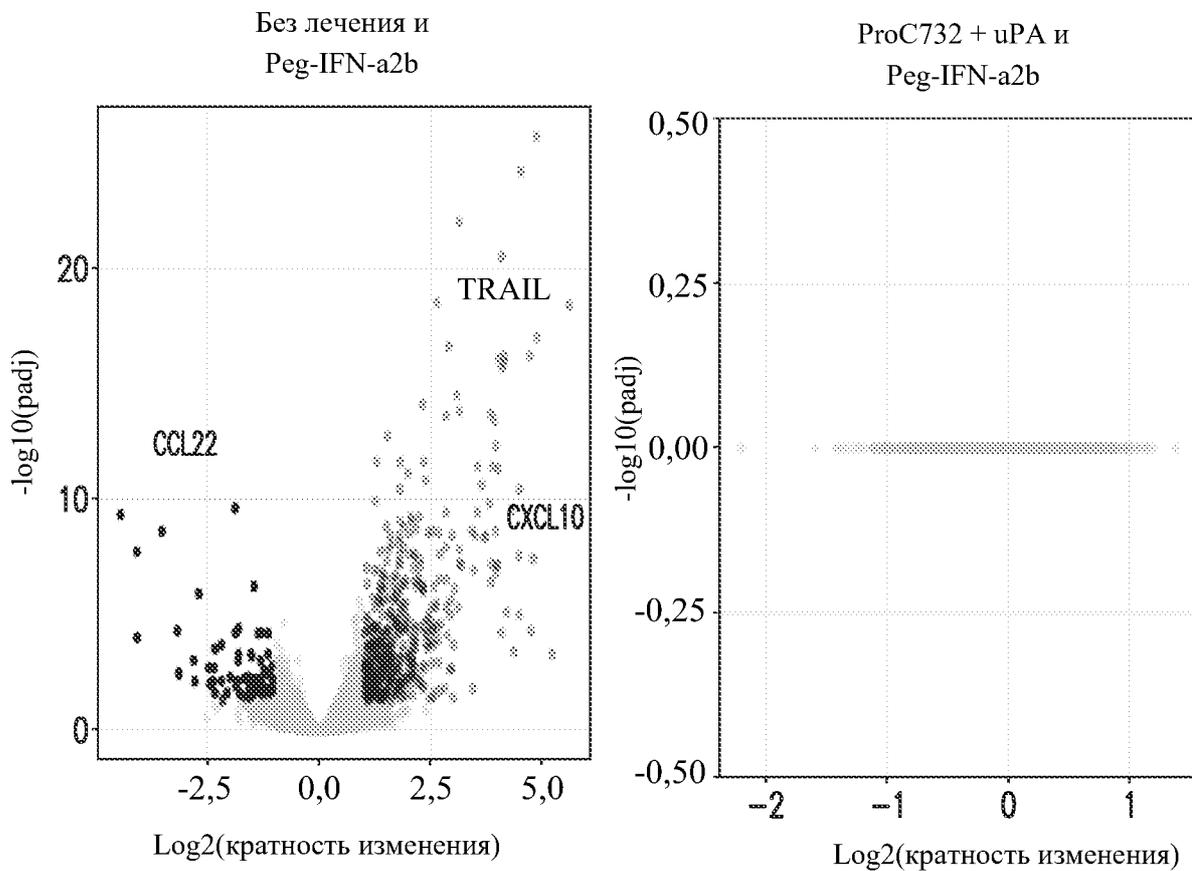


ФИГ. 24В



Фиг. 2.4.2 Вулканная диаграмма

ФИГ. 25



Фиг. 2.4.2 Вулканная диаграмма

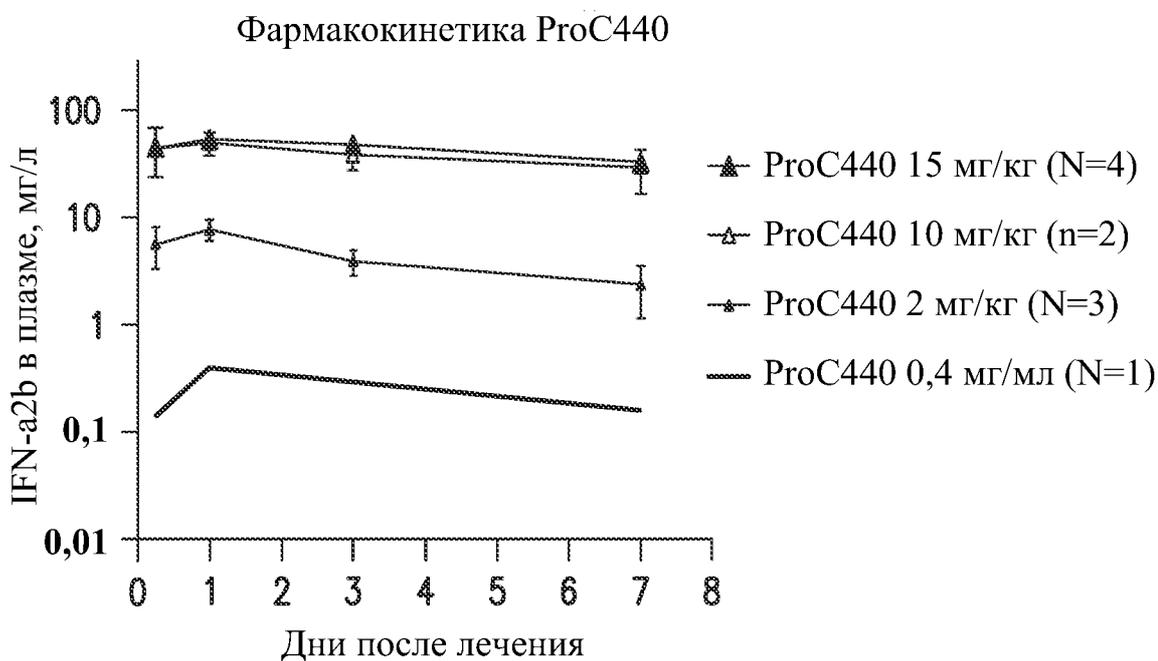
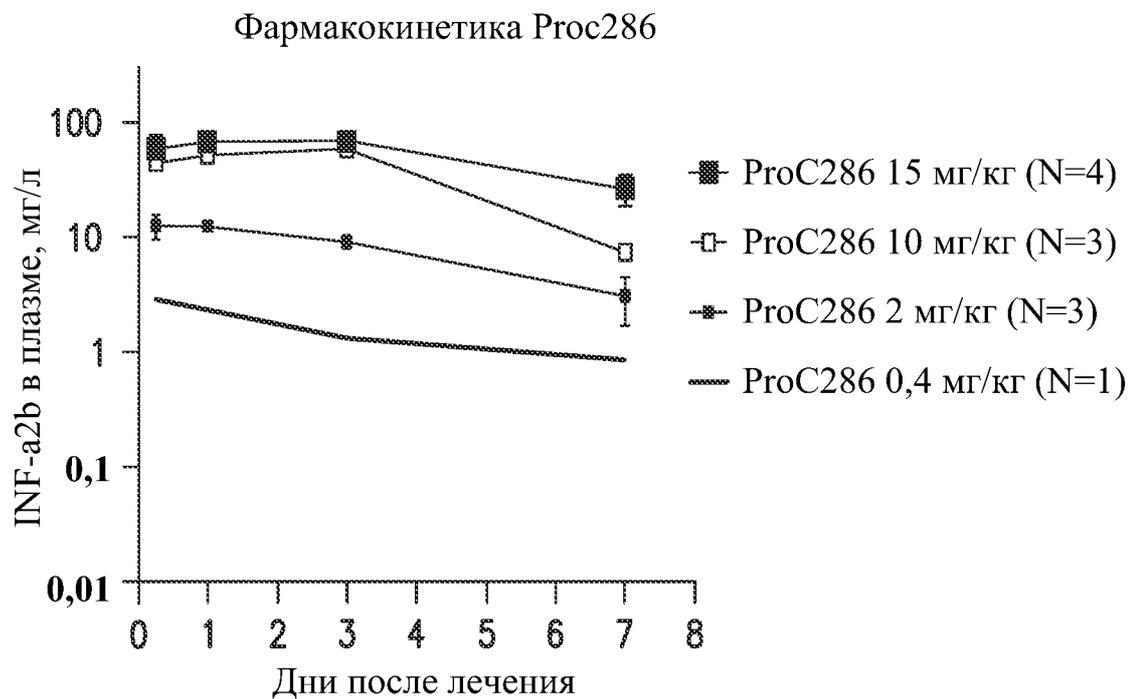
↑ гены: 480

↓ гены: 86

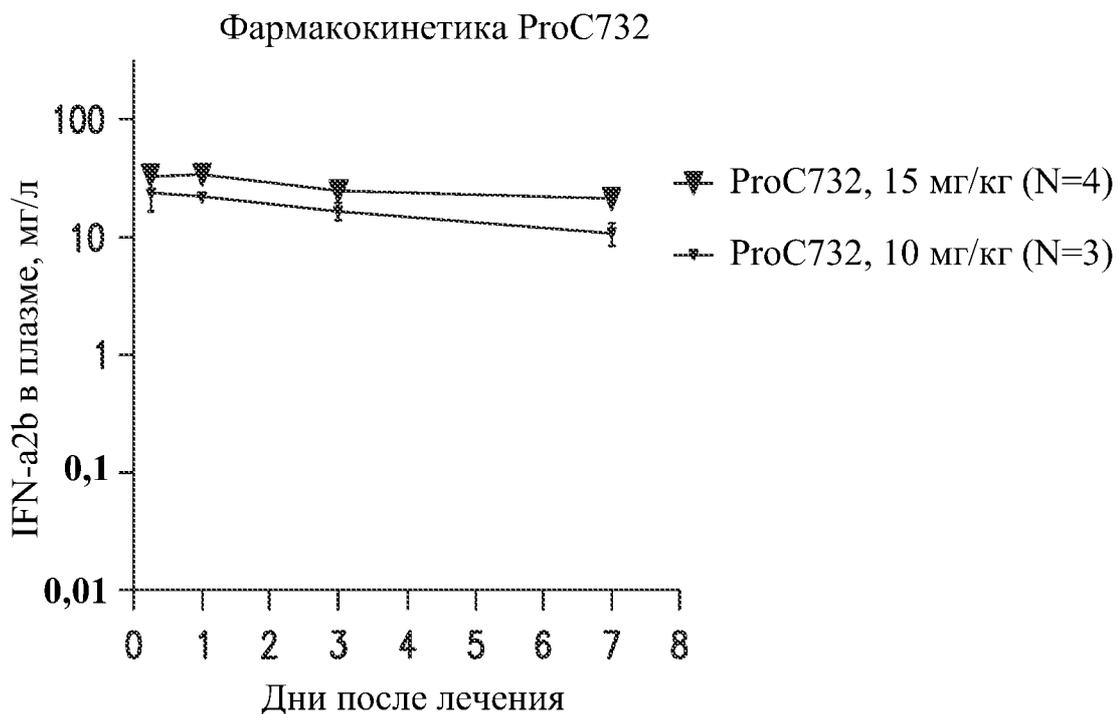
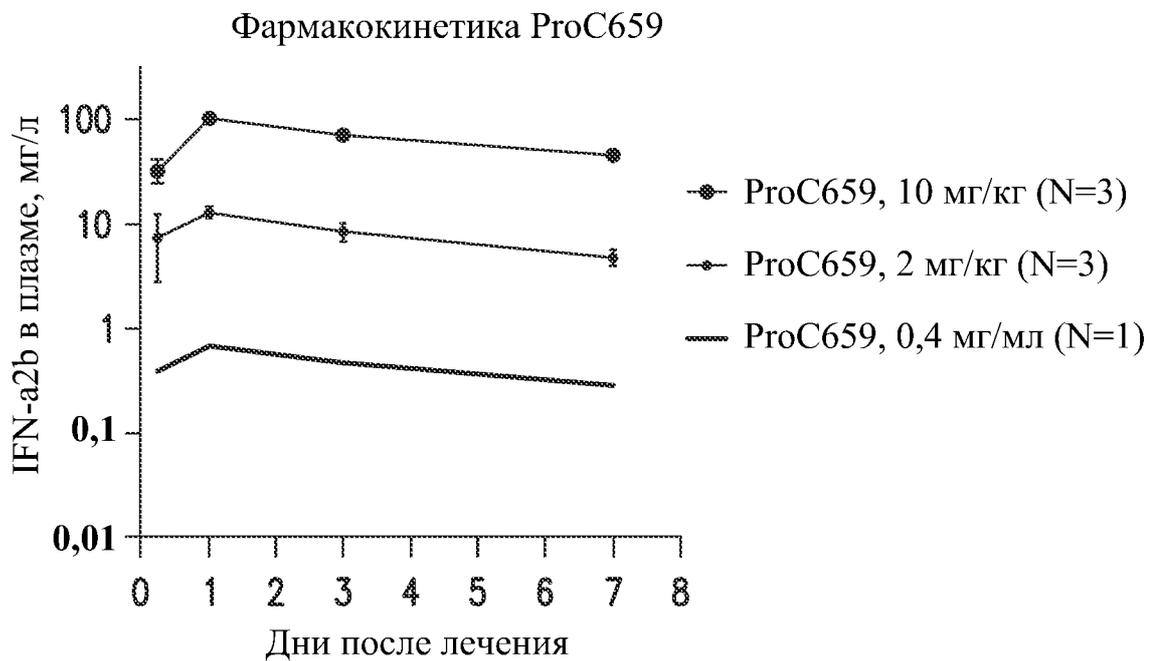
↑ гены: 0

↓ гены: 0

ФИГ. 25 (продолжение)



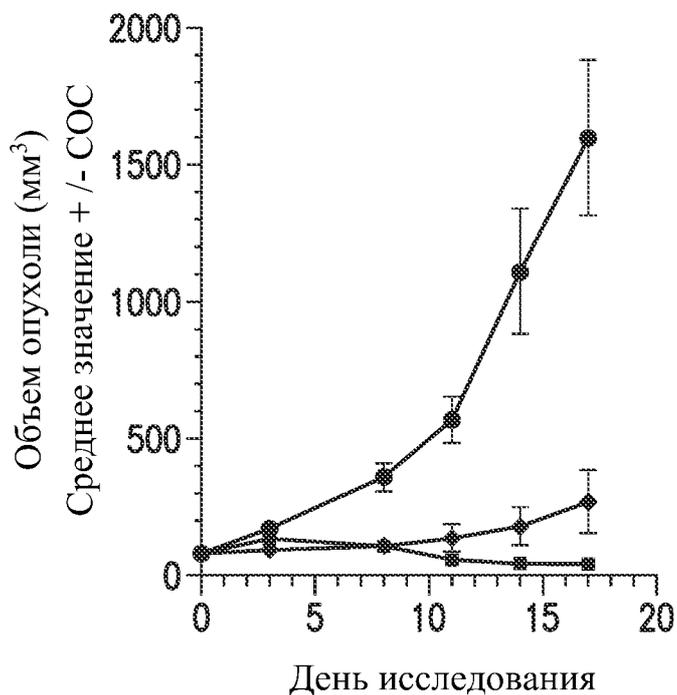
ФИГ. 26



ФИГ. 26 (продолжение)

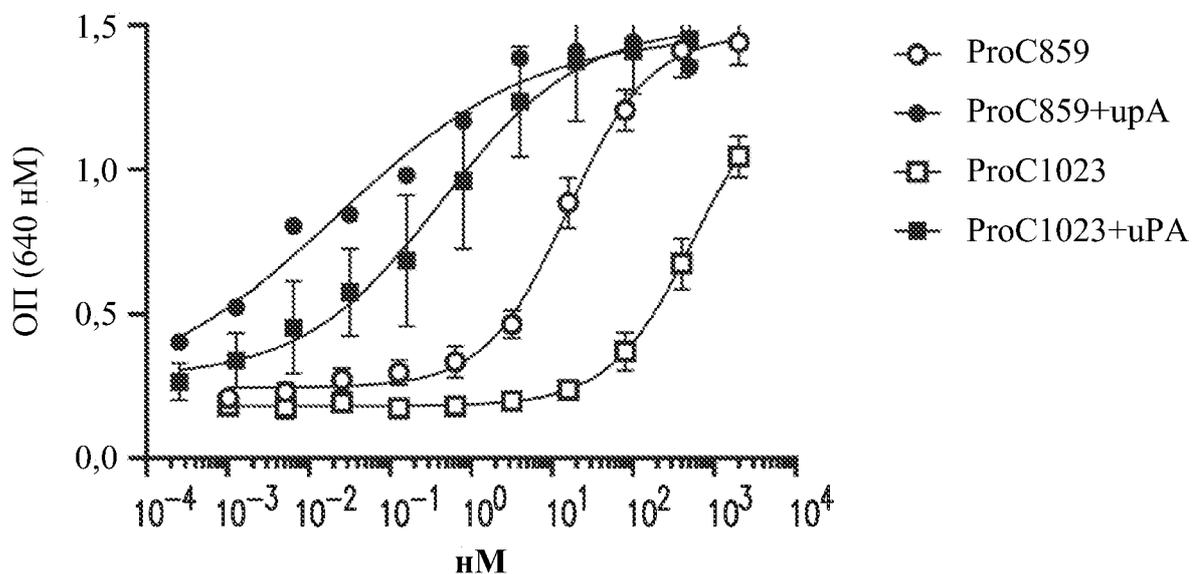
- PBS (20 мкл, в/б)
- ◆ ProC859 (20 мкг в 20 мкл, в/б)
- ProC859 (200 мкг в 200 мкл, п/к)

Активность ProC859 в модели опухоли МС38

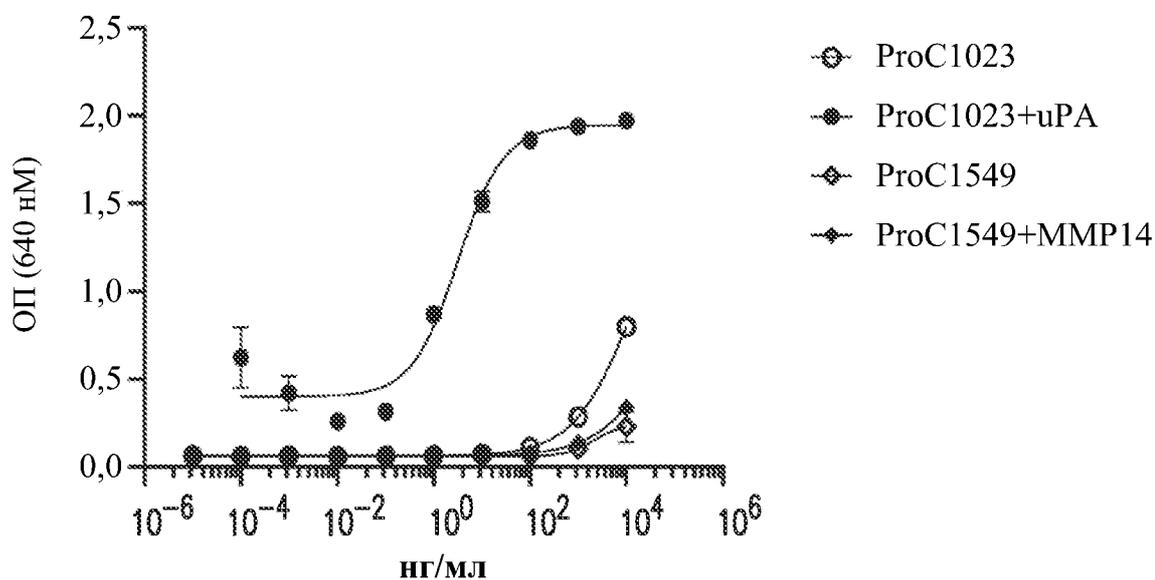


ФИГ. 27

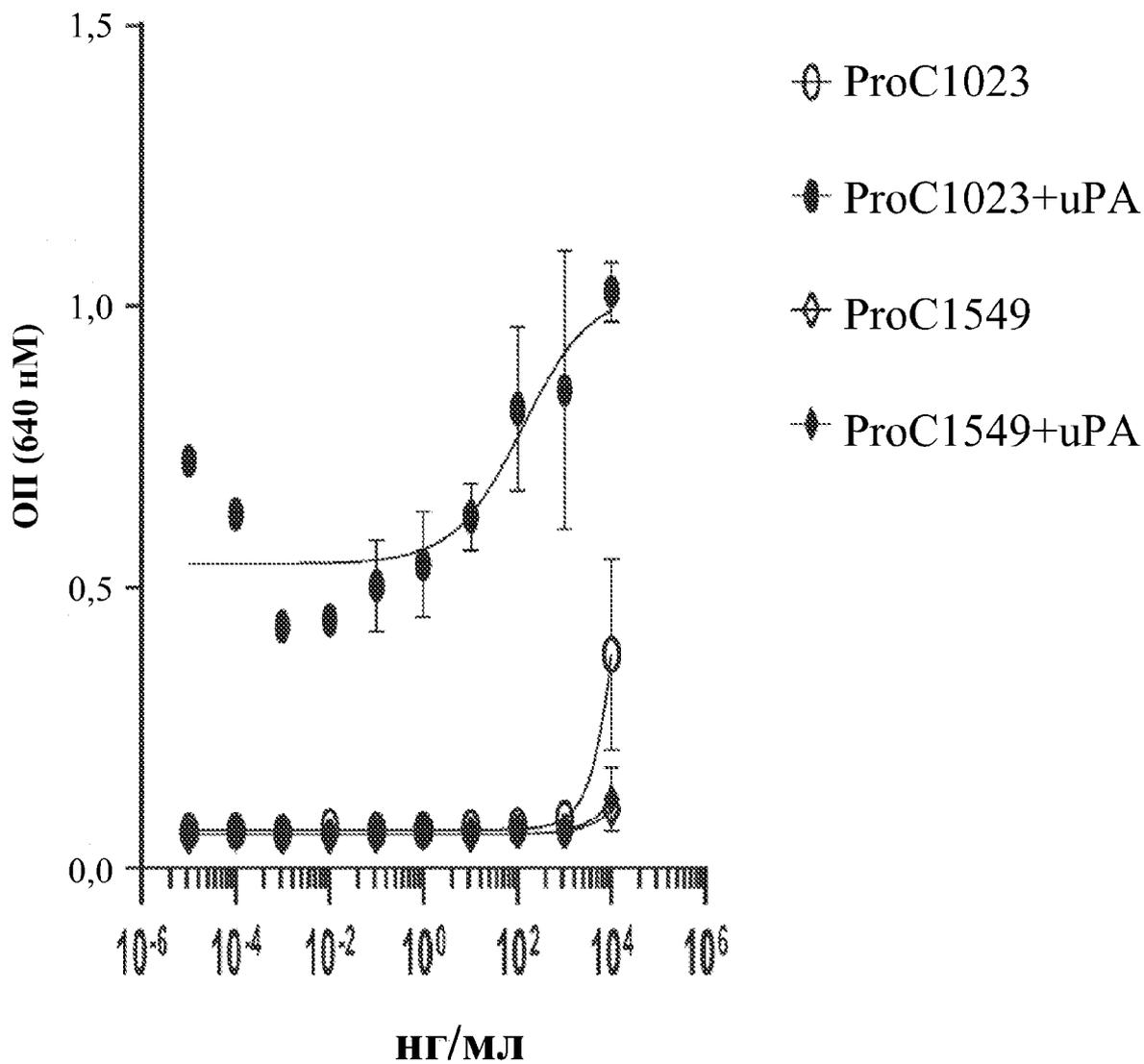
Репортерный анализ IFN α В16



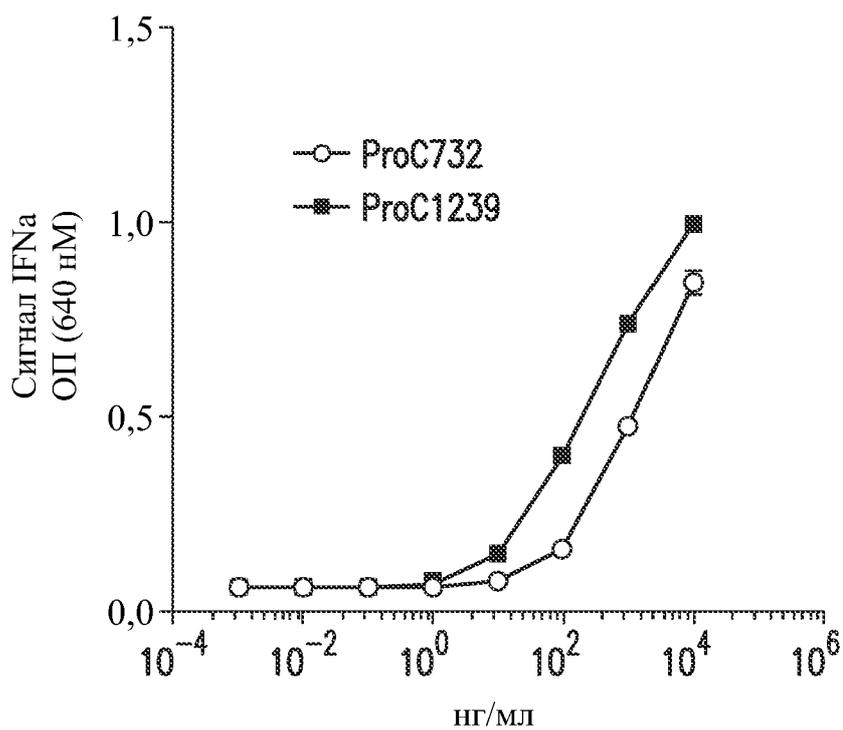
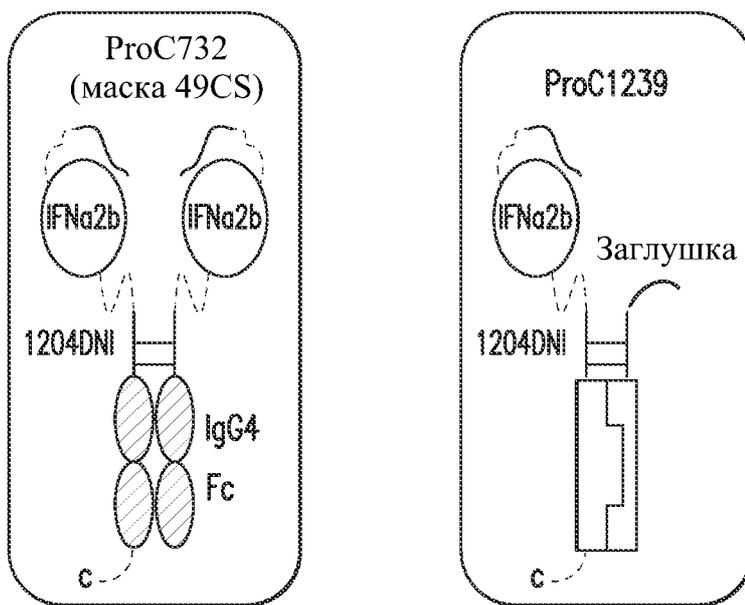
ФИГ. 28А



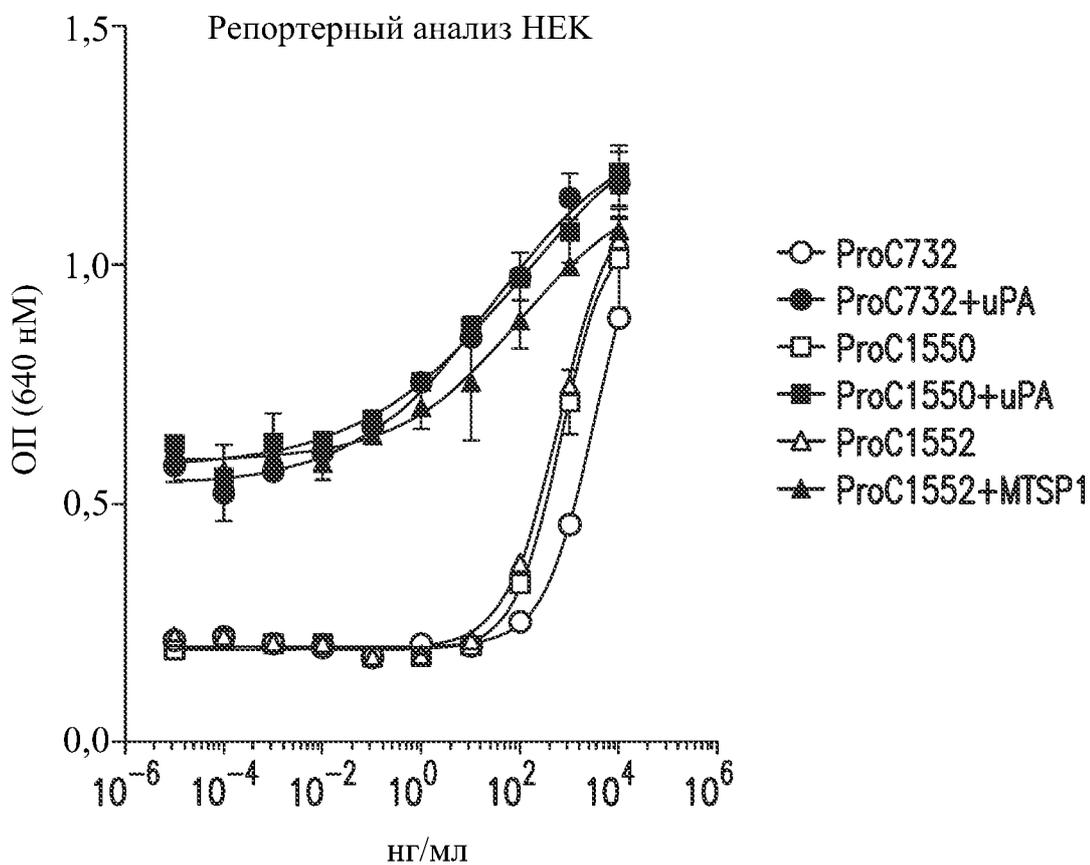
ФИГ. 28В



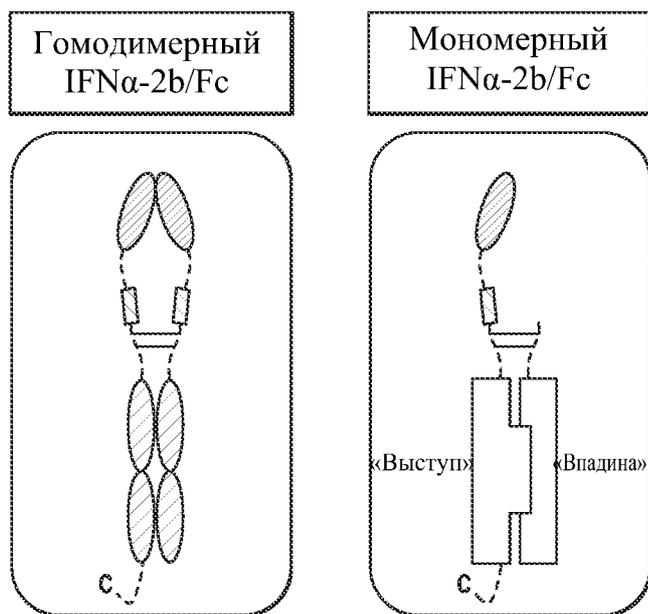
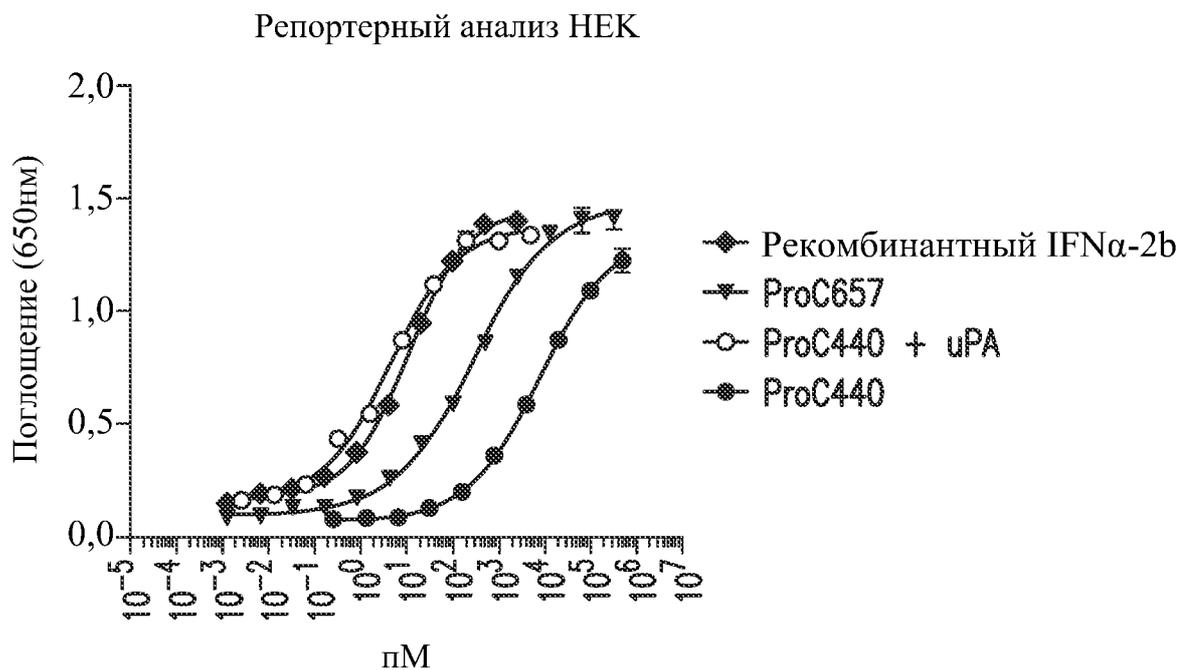
ФИГ. 28С



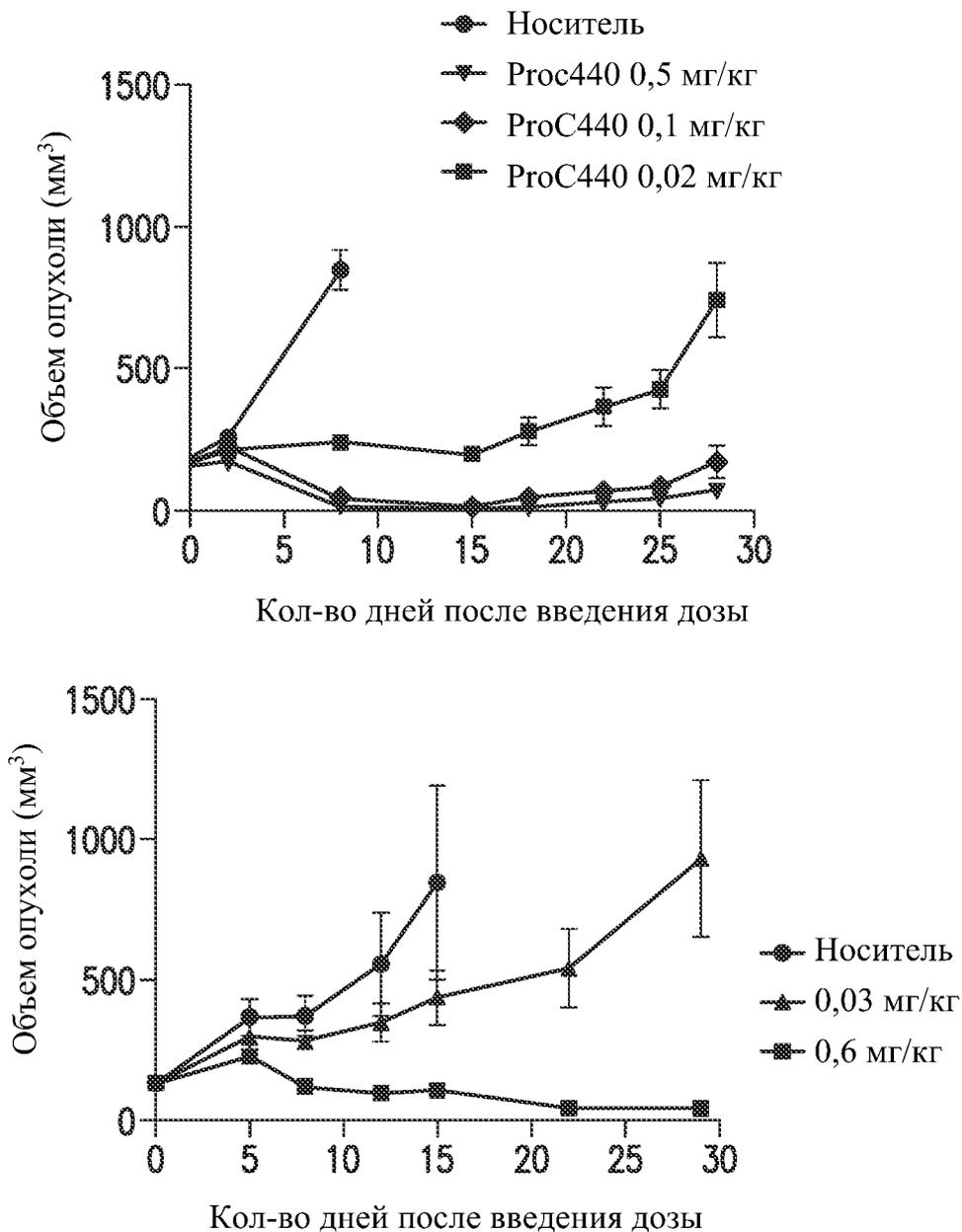
ФИГ. 29



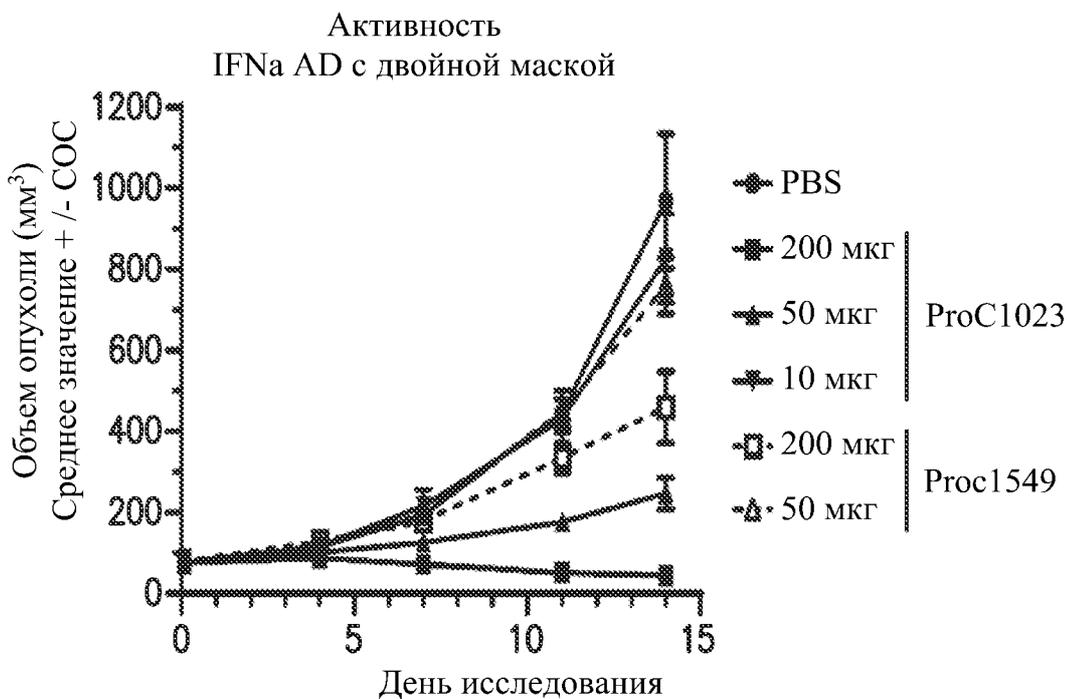
ФИГ. 30



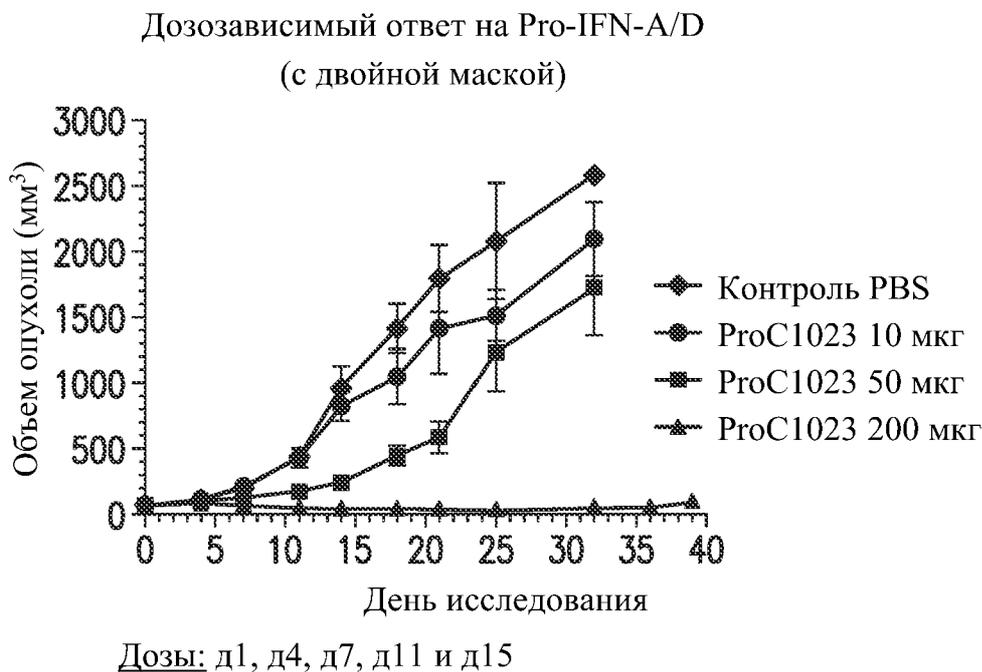
ФИГ. 31



ФИГ. 32



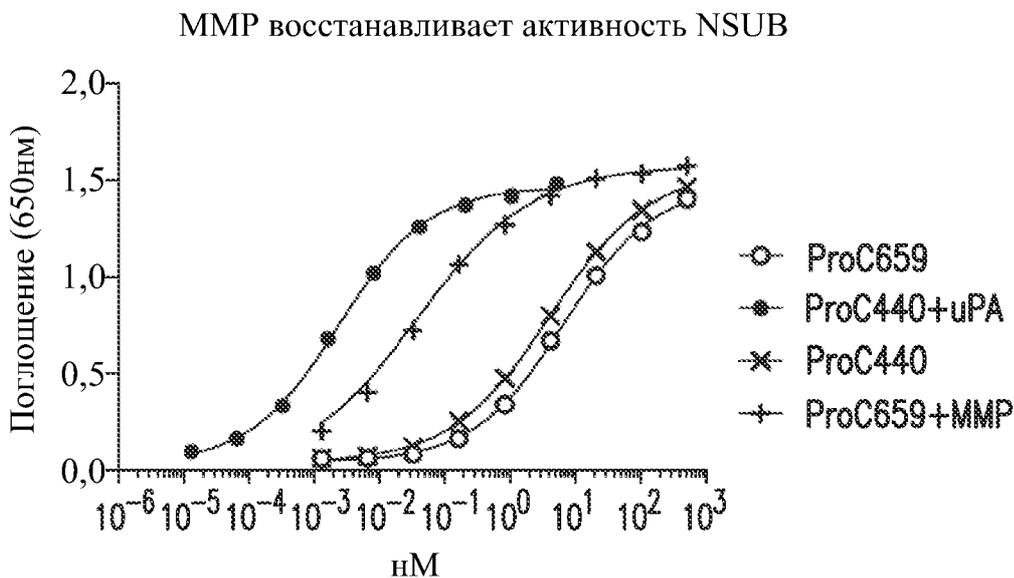
ФИГ. 33



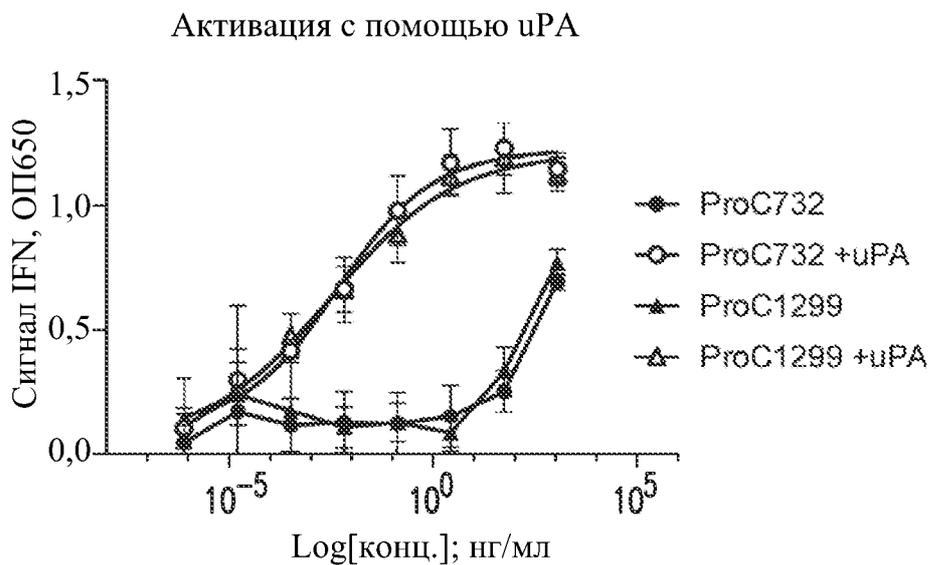
ФИГ. 34А



ФИГ. 34В

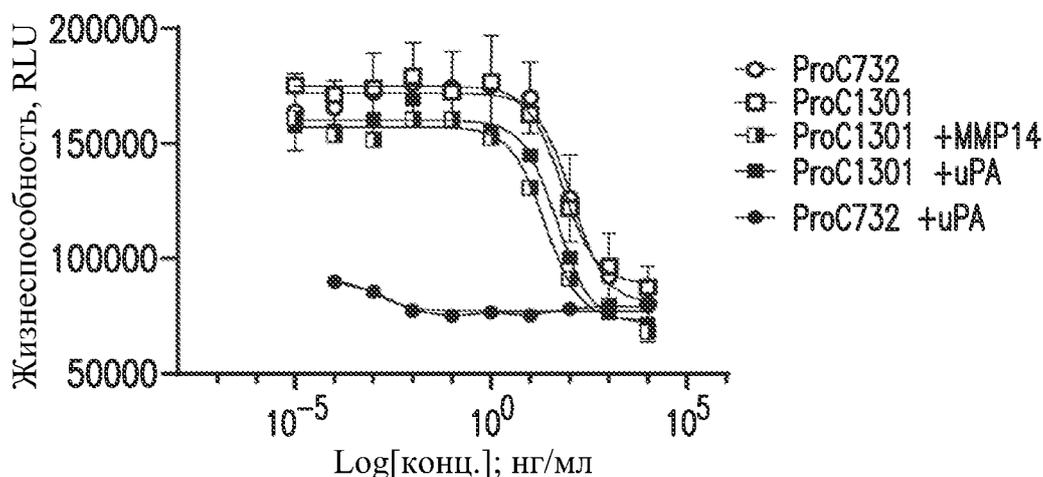


ФИГ. 35А



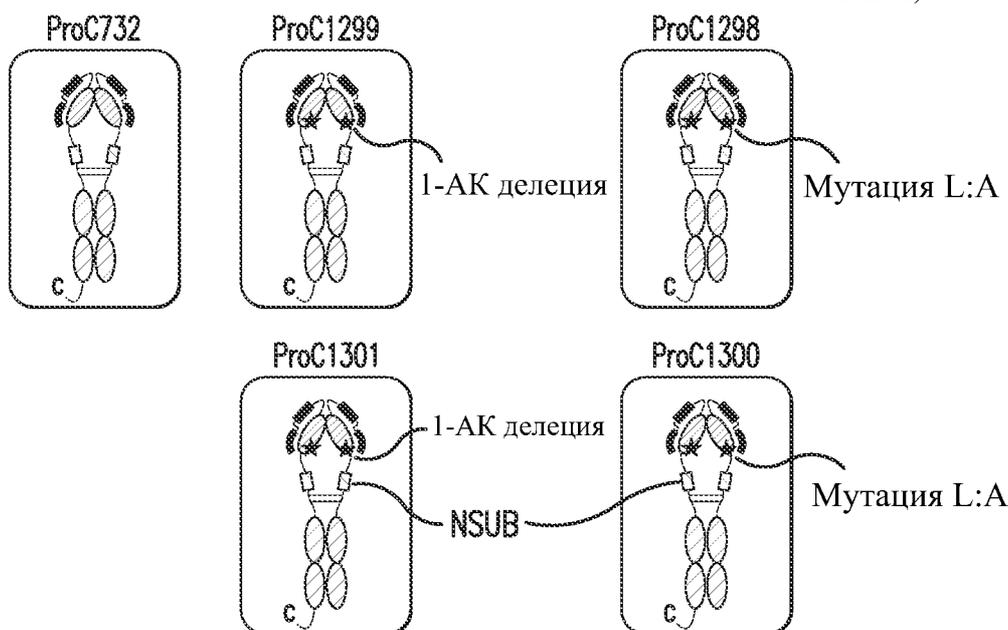
ФИГ. 35В

Контроль NSUB устойчив к активации



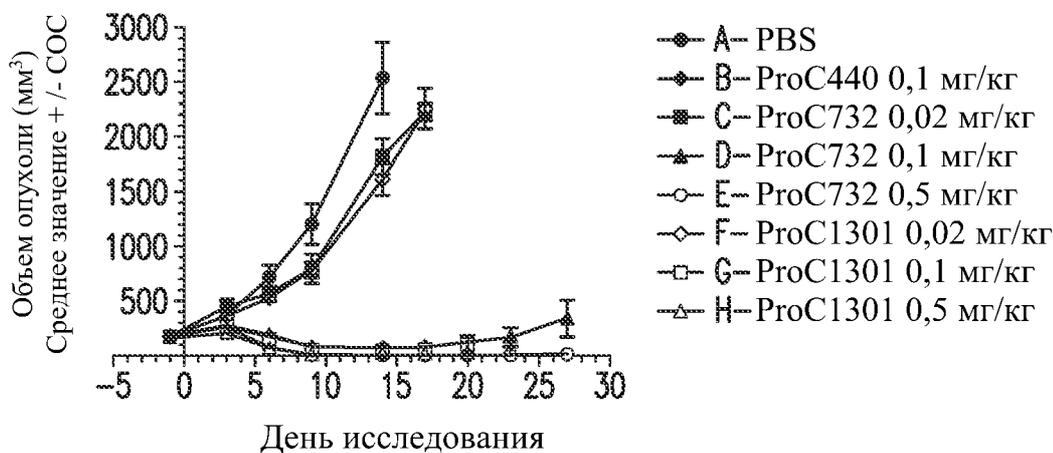
IFN α 2b	1	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMI	60
IFN α AD	1	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMI	60
IFN α 2b	61	QQIFNLFSTKDSSAAWDELTDKFKYELYQQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVR	120
IFN α AD	61	QQIFNLF+TKDSSAAWDE LLDKF TELYQQQLNDLEACV+Q V ETPLM DSILAV+	120
IFN α 2b	121	KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE	165
IFN α AD	121	KYFRRITLYLTKKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRKE	165

L161 (Расщепление MMP14)
 L157 и 161 (прогнозируемое расщепление MMP12)



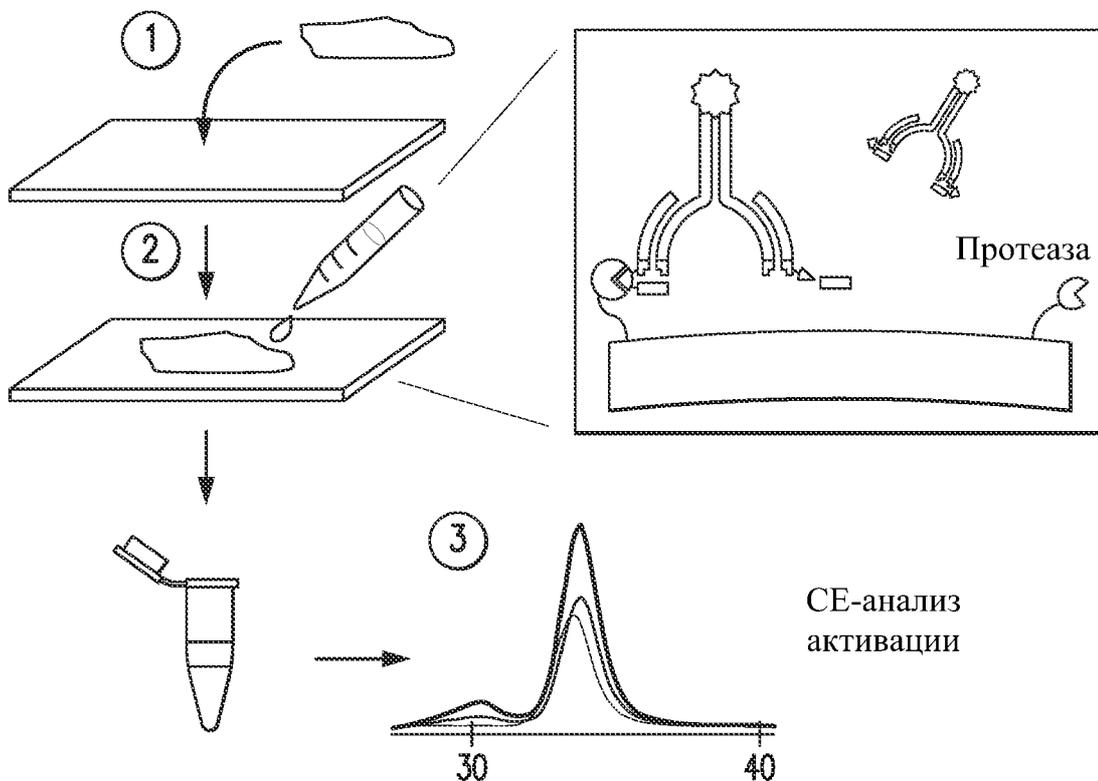
ФИГ. 35С

Рост опухоли
 C21-017 модель Daudi IFN α Fc ProC732 и NSUB

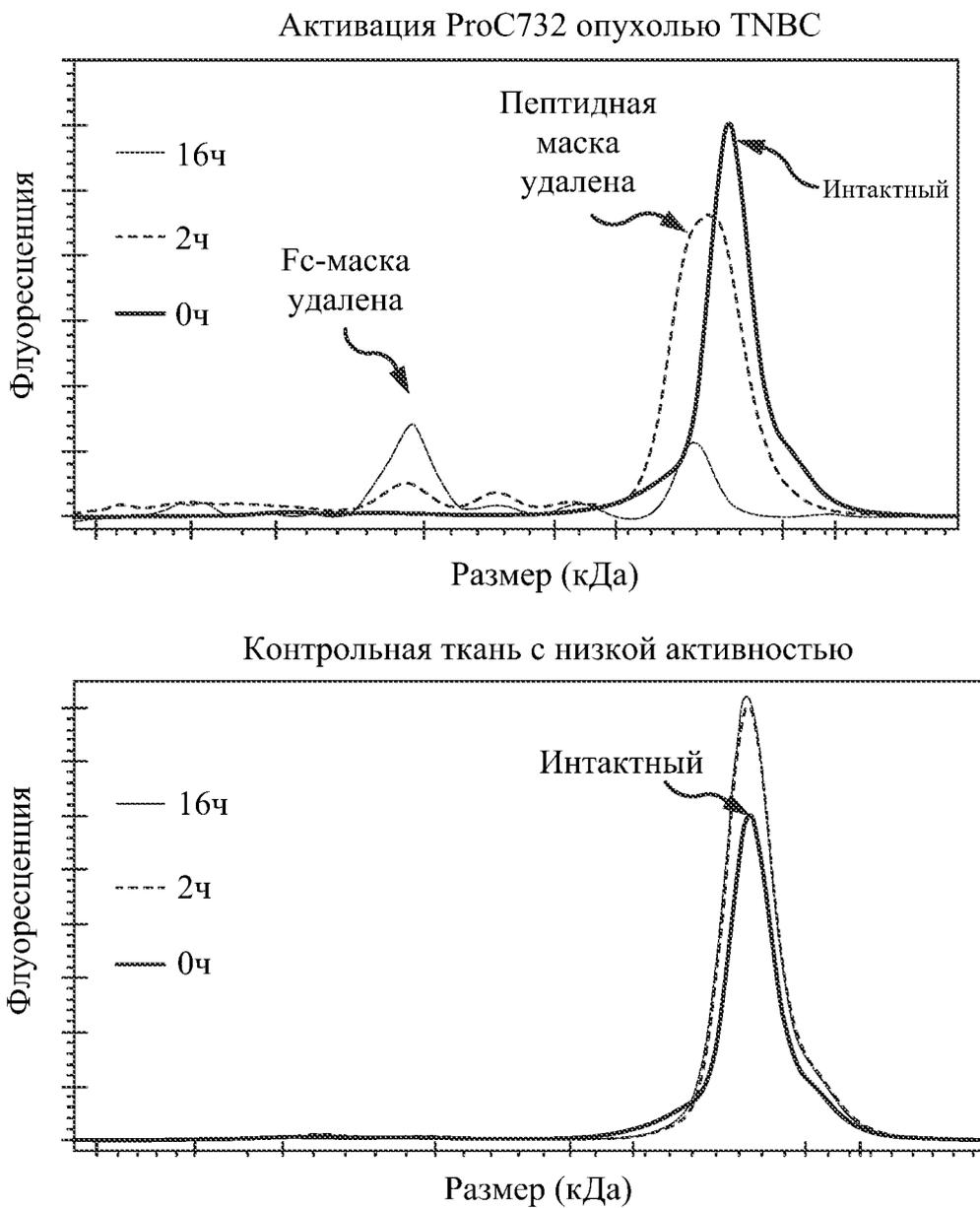


Доза на д1, д8, д15, и д21

ФИГ. 36

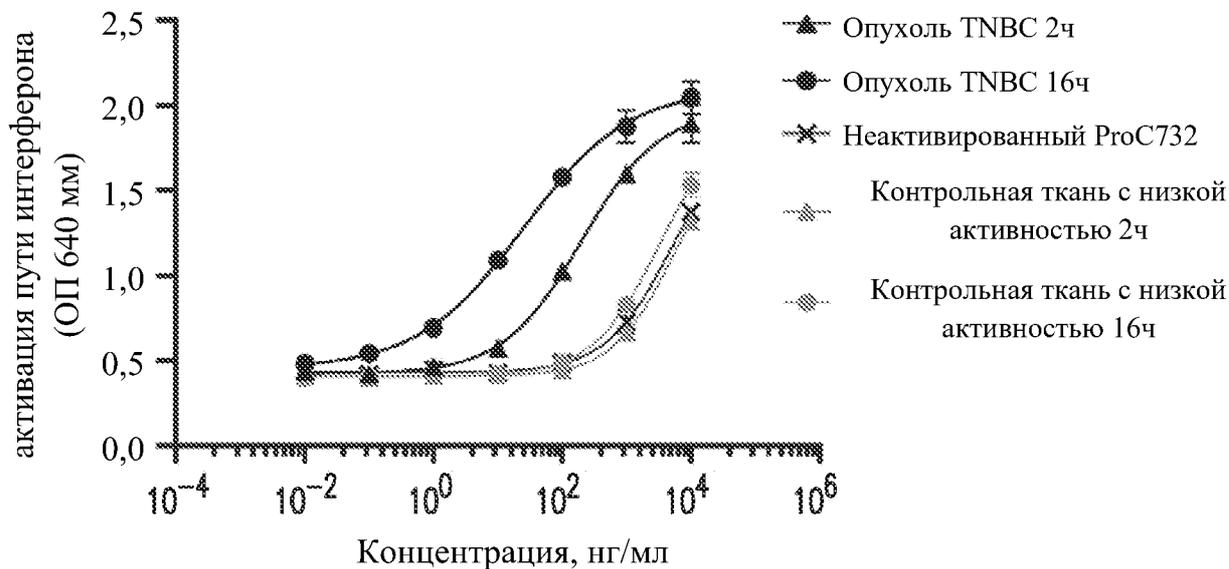


ФИГ. 37А

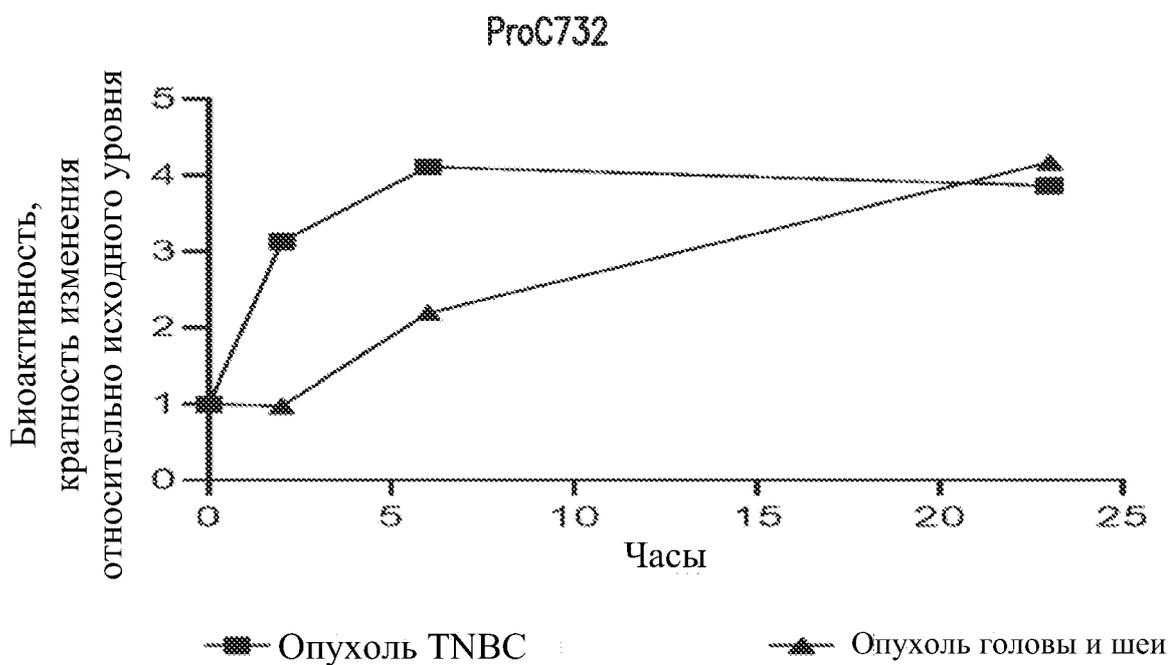


ФИГ. 37В

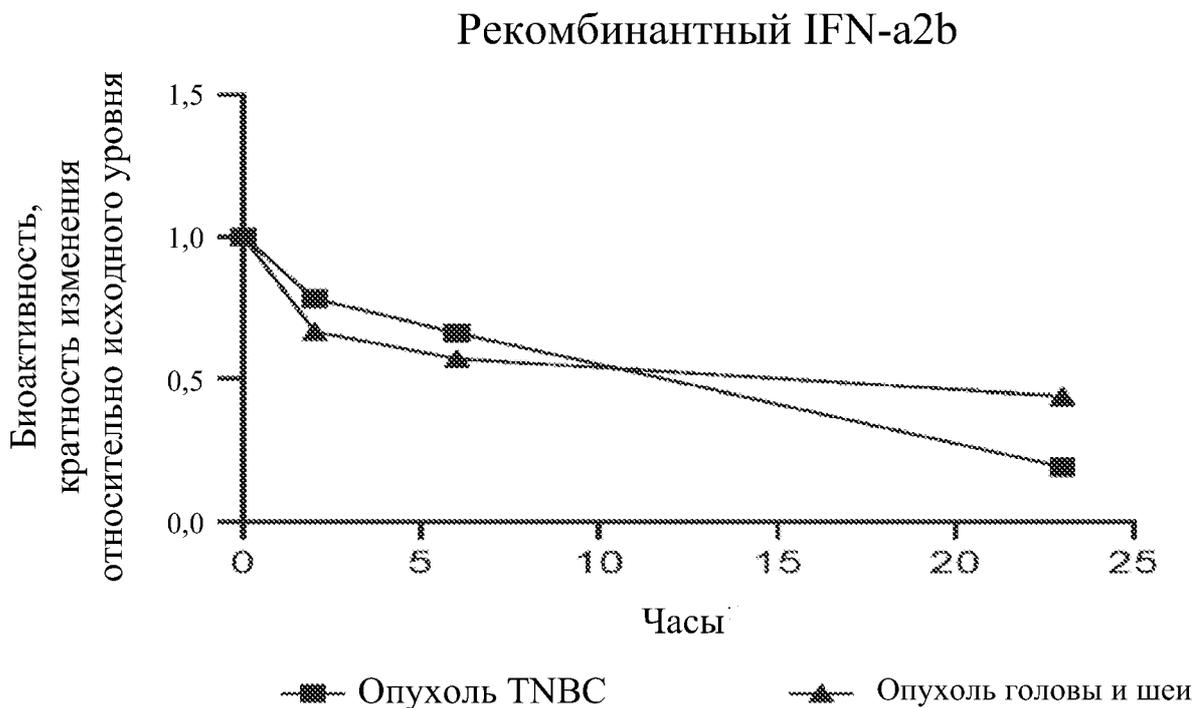
Флуоресценция



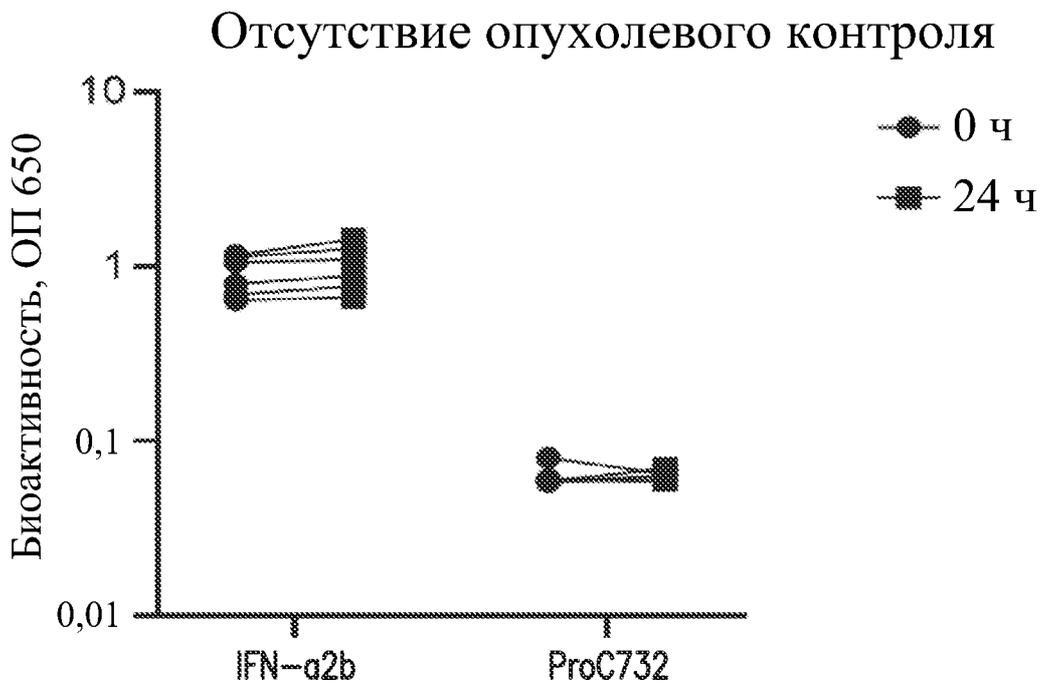
ФИГ. 37С



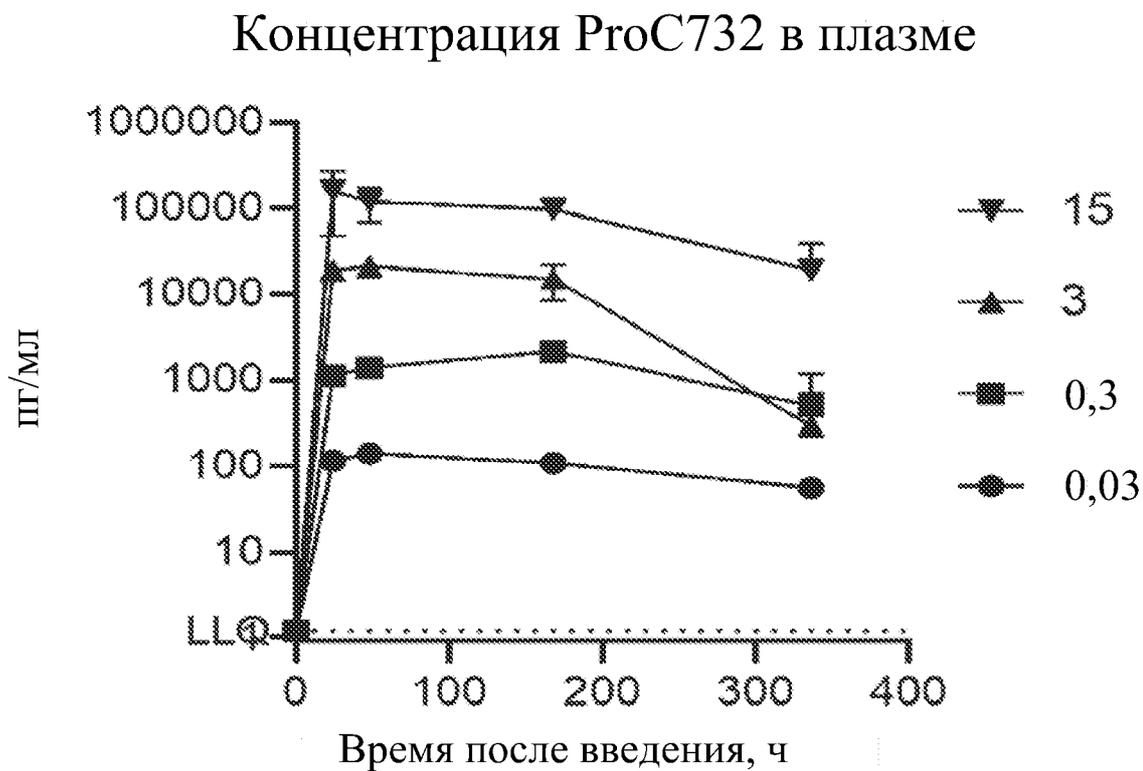
ФИГ. 38А



ФИГ. 38В

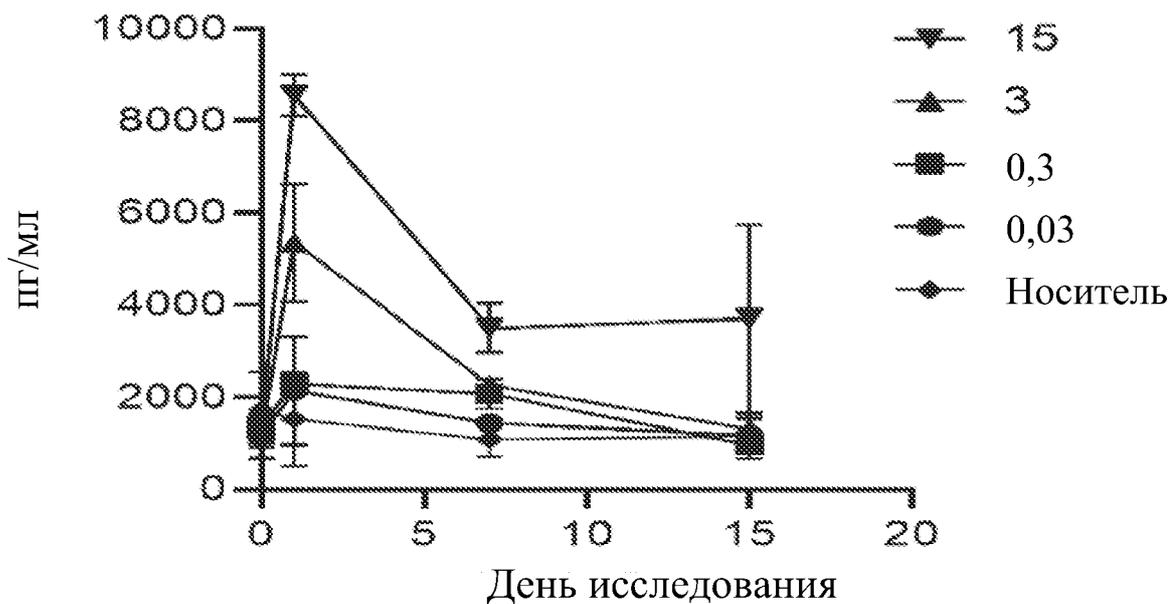


ФИГ. 38С

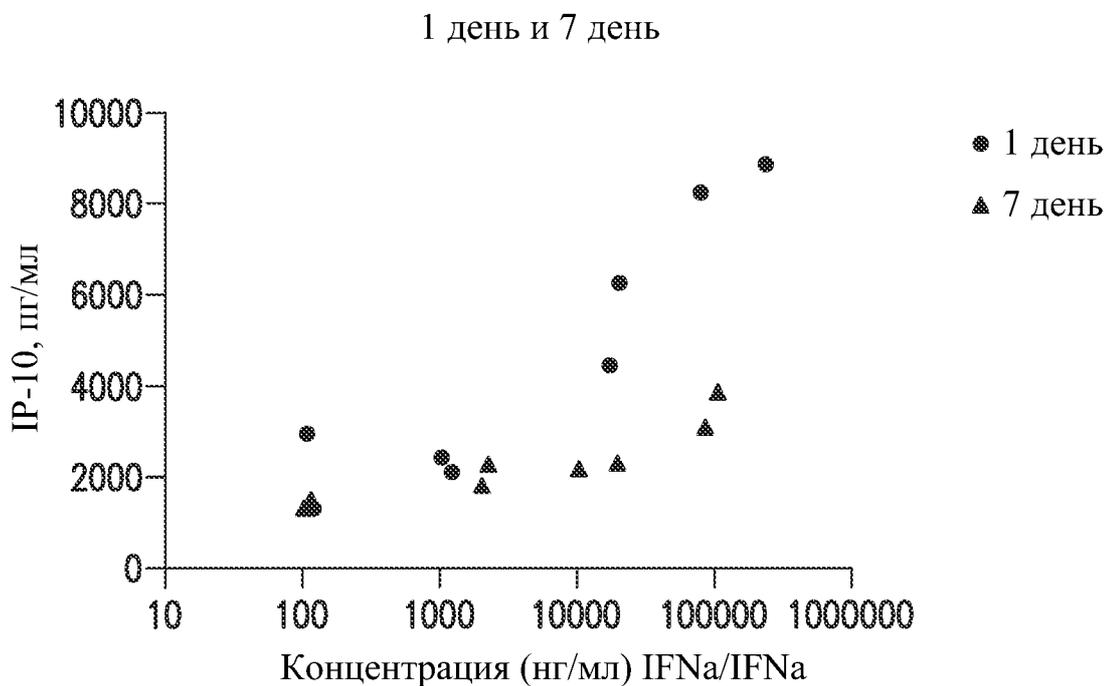


ФИГ. 39

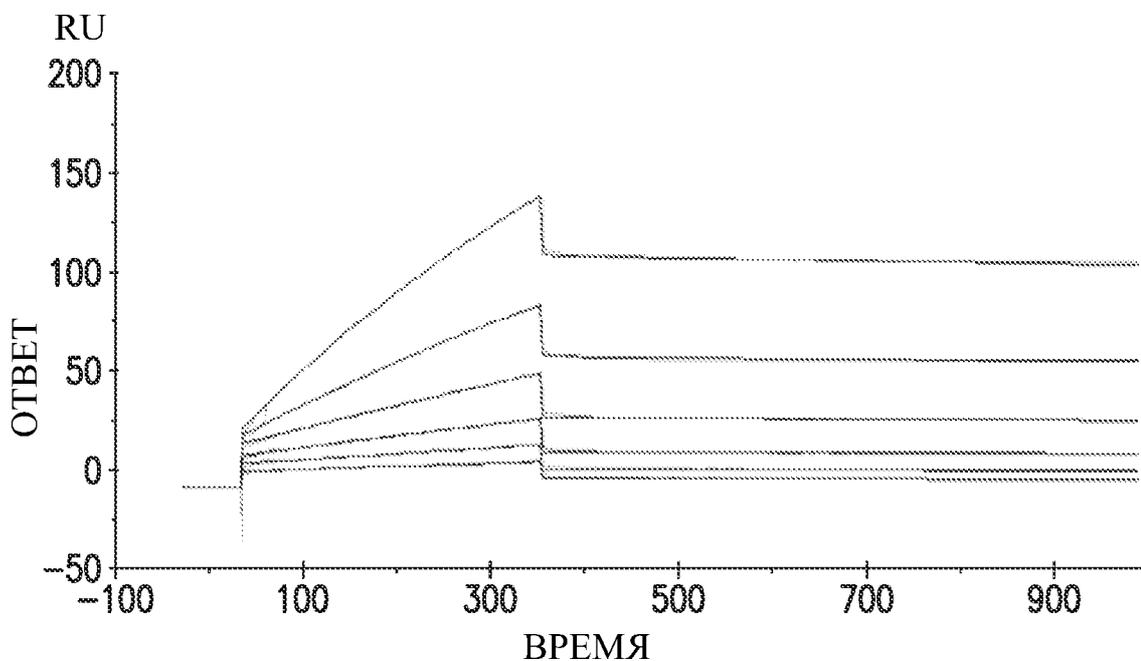
IP-10



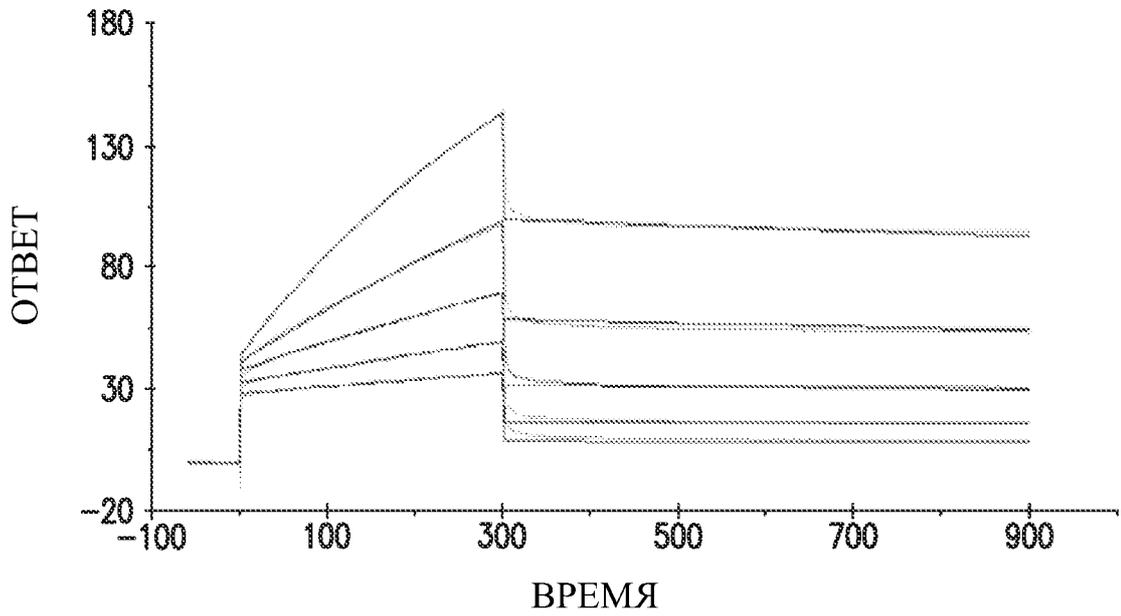
ФИГ. 40А



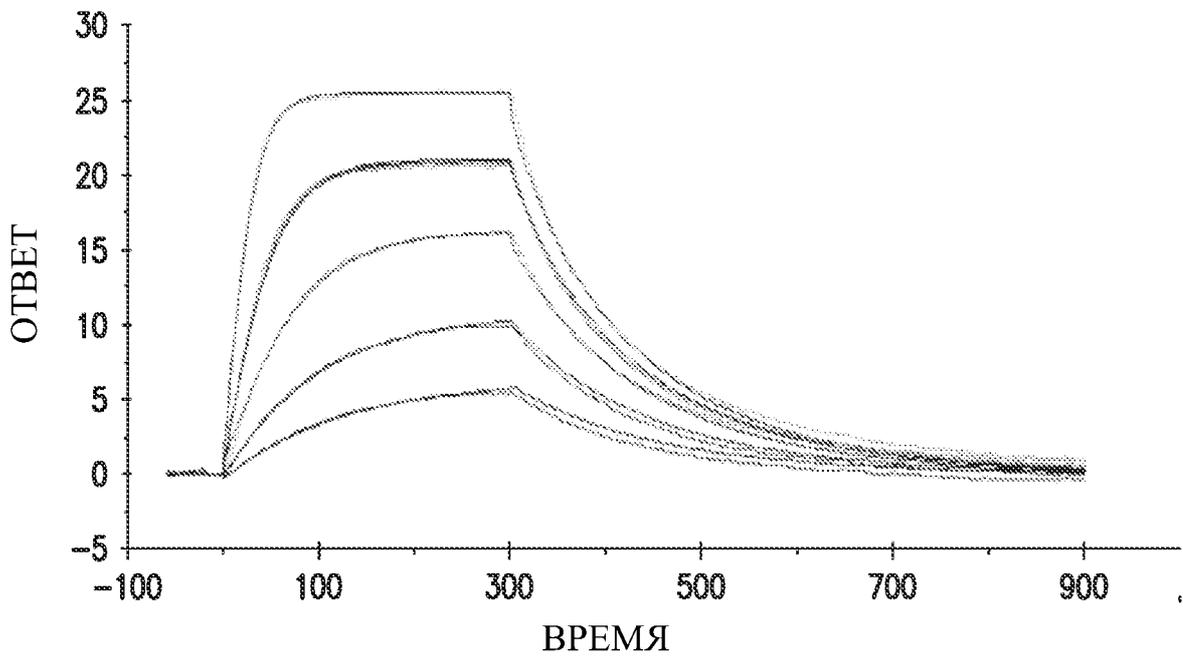
ФИГ. 40В



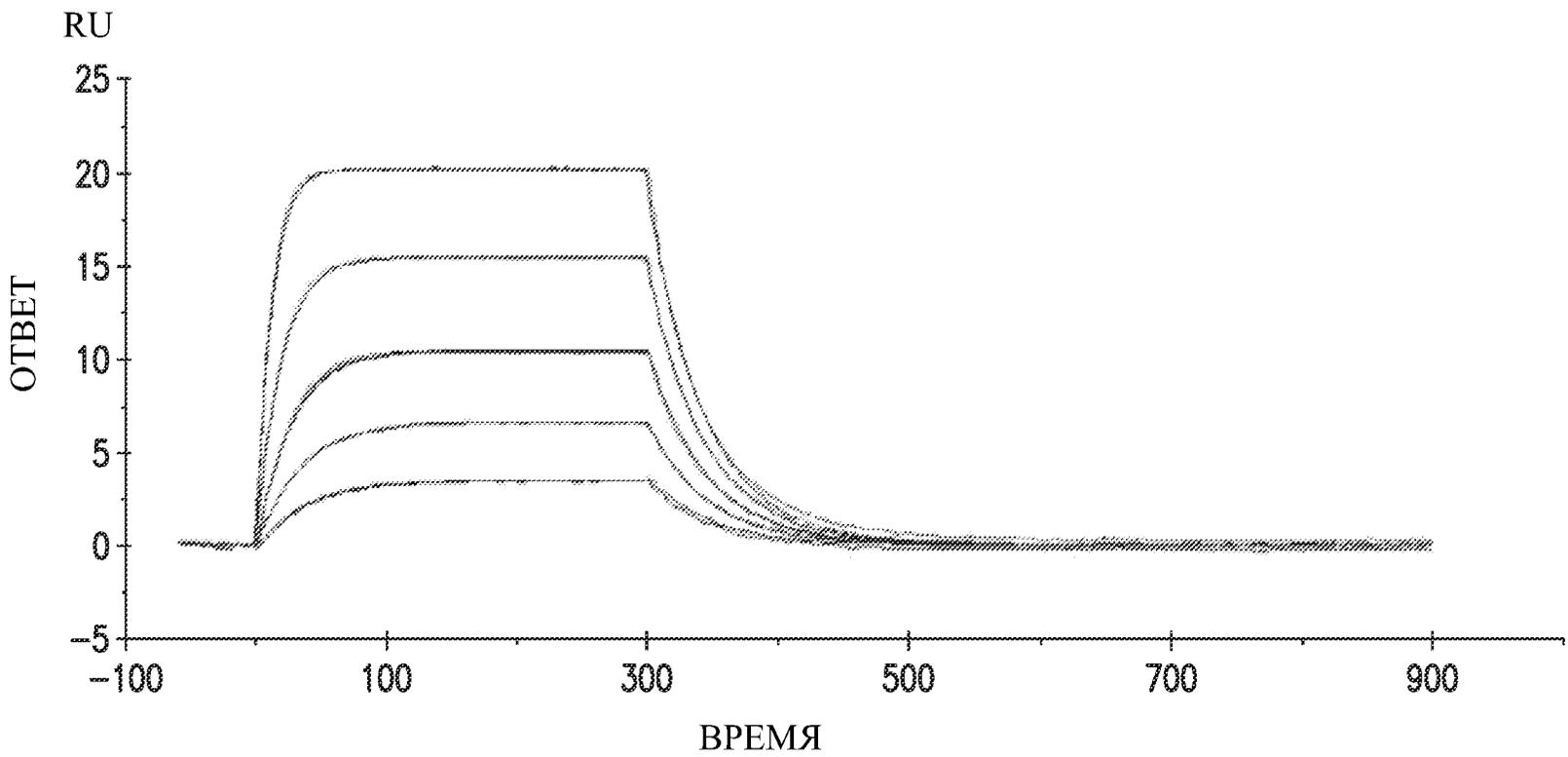
ФИГ. 41А



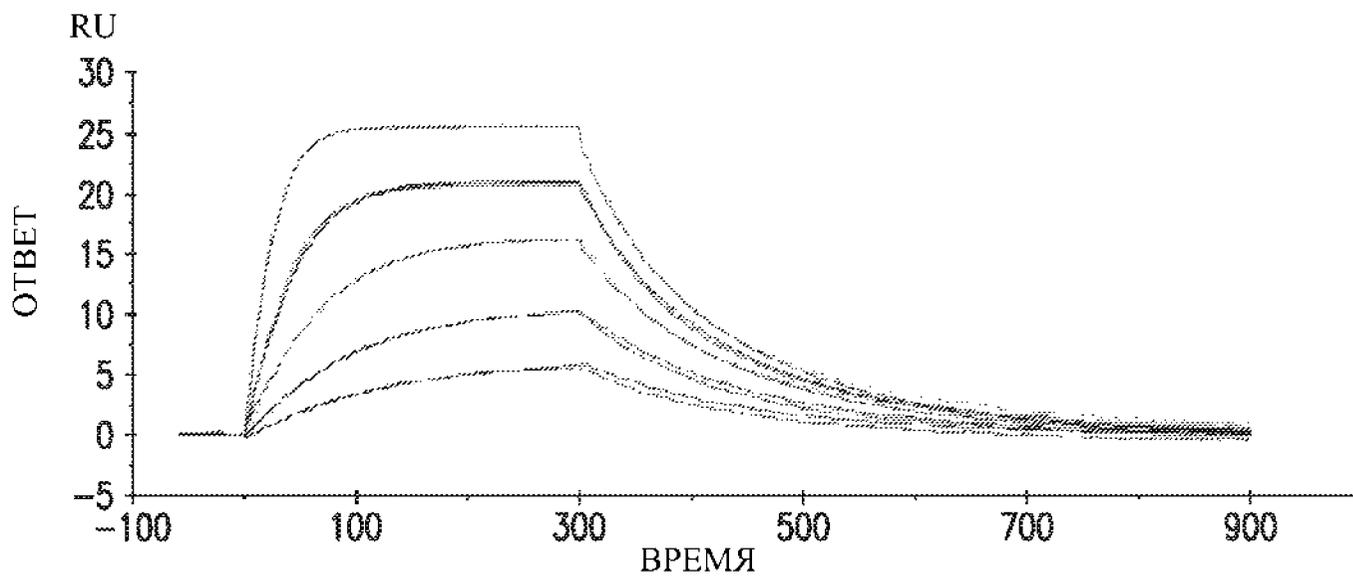
ФИГ. 41В



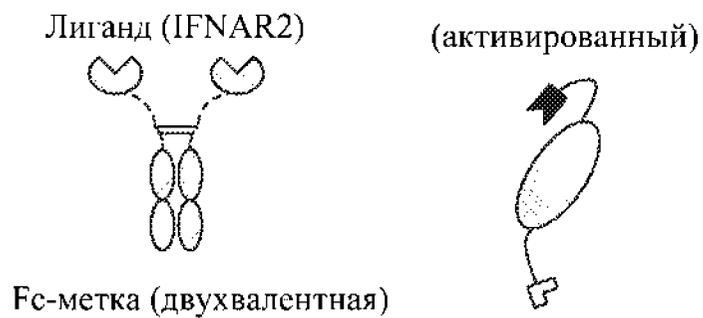
ФИГ. 41С



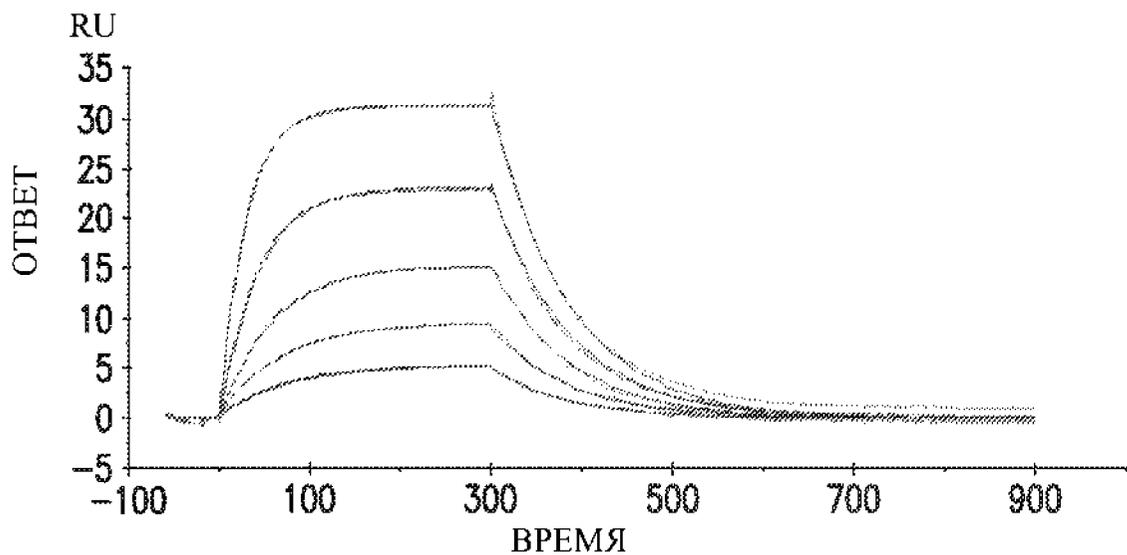
ФИГ. 41D



Лиганд	Аналит	k_a (1/М*с)	k_d (1/с)	KD (нМ)
ProC1823	ProC1640	4,374E+06	1,195E-02	2,731

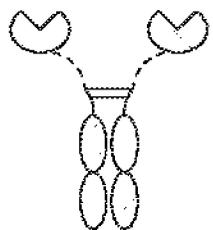


ФИГ. 42А



Лиганд	Аналит	k_a (1/М*с)	k_d (1/с)	KD (нМ)
ProC1823	ProC1976	8,985E+04	1,175E-02	130,8

Лиганд (IFNAR2)



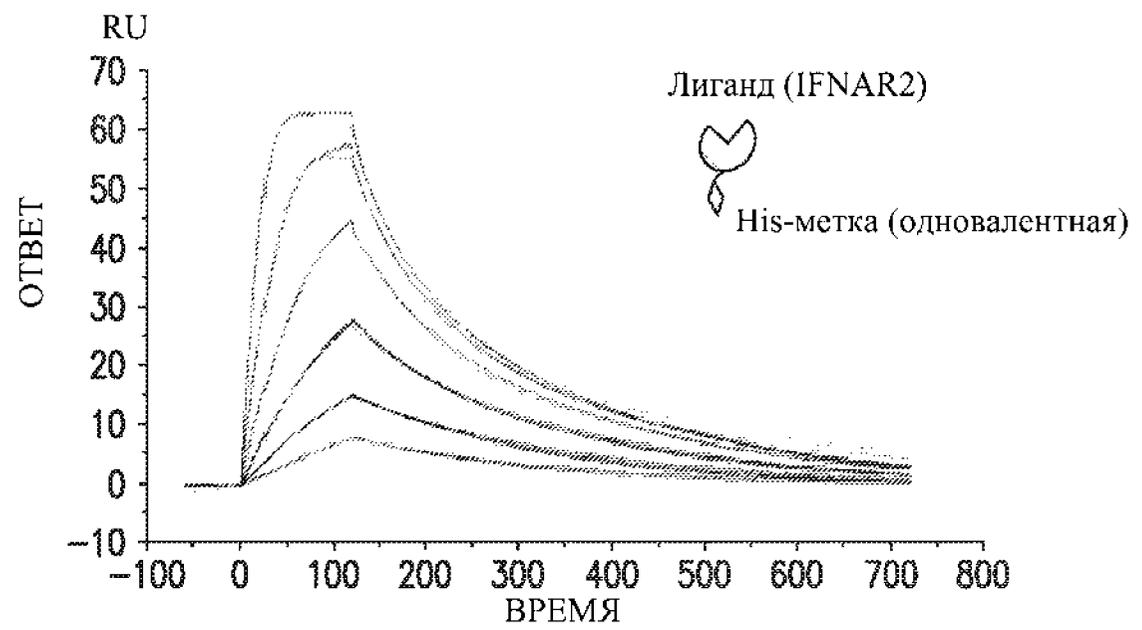
Fc-метка (двухвалентная)

(пептидная маска)



ФИГ. 42В

Связывание ProC1640 с человеческим IFNAR2 с His-меткой

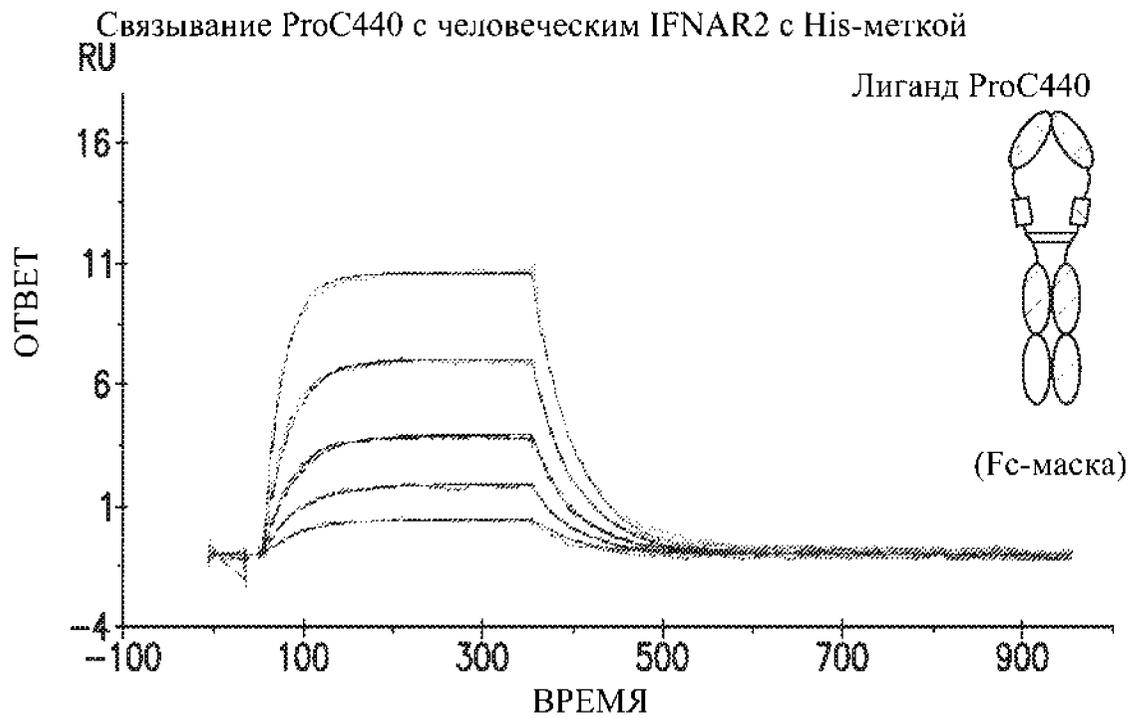


Лиганд	Аналит	k_a (1/M*s)	k_d (1/s)	KD (нМ)
ProC1718	ProC1640	5,177E+06	1,214E-02	2,344

(активированный)



ФИГ. 42С

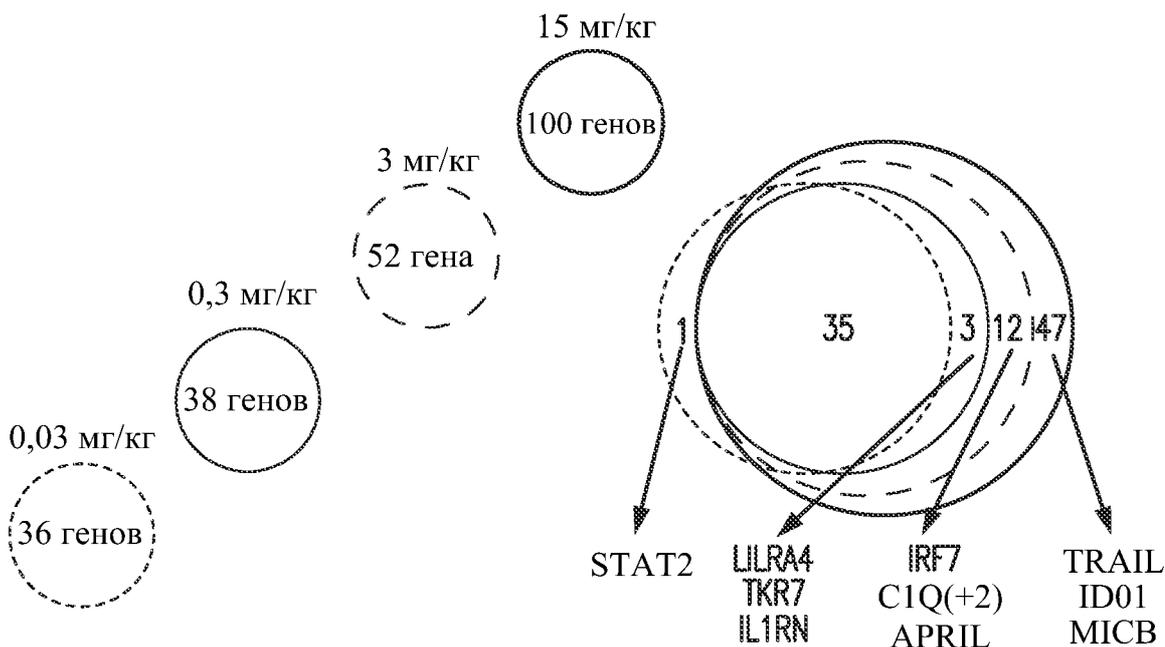


Лиганд	Аналит	k_a (1/M*s)	k_d (1/c)	KD (нМ)
ProC440	ProC1718	2,055E+05	2,077E-02	101,1

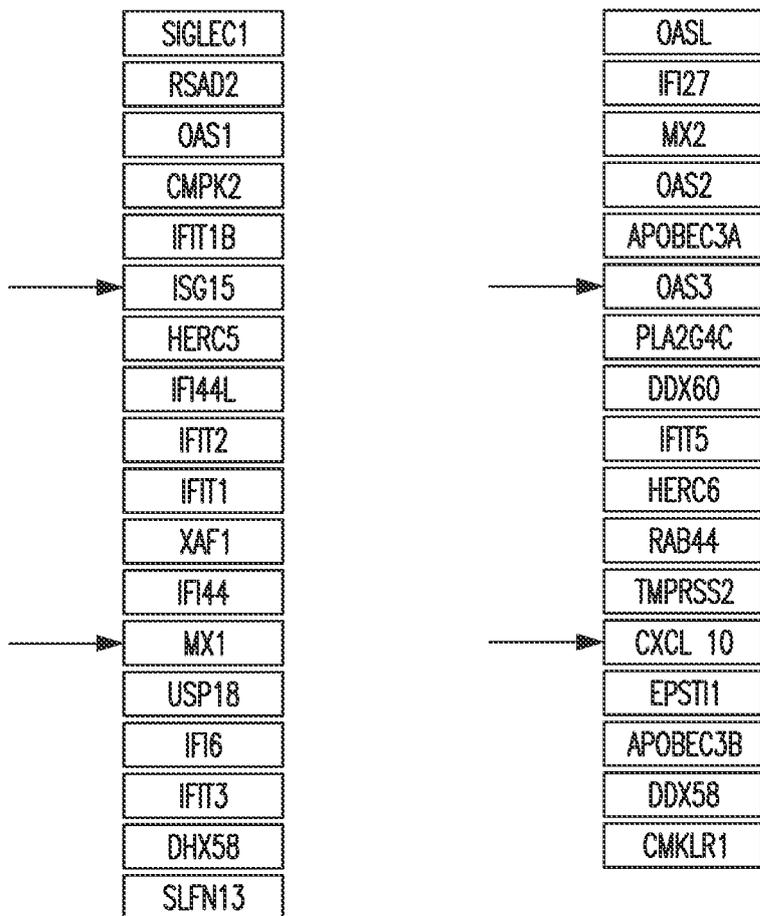


His-метка (одновалентная)

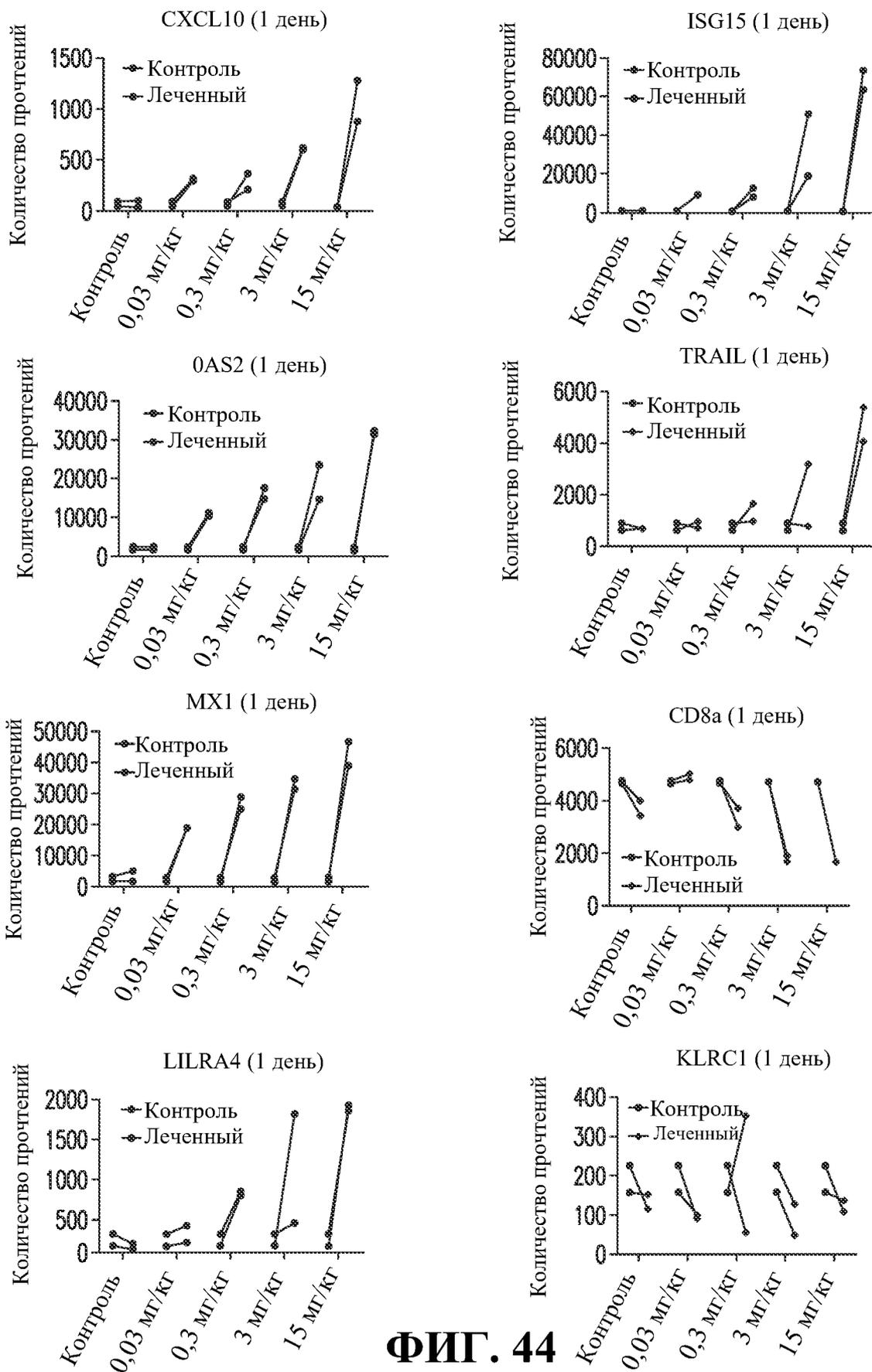
ФИГ. 42D



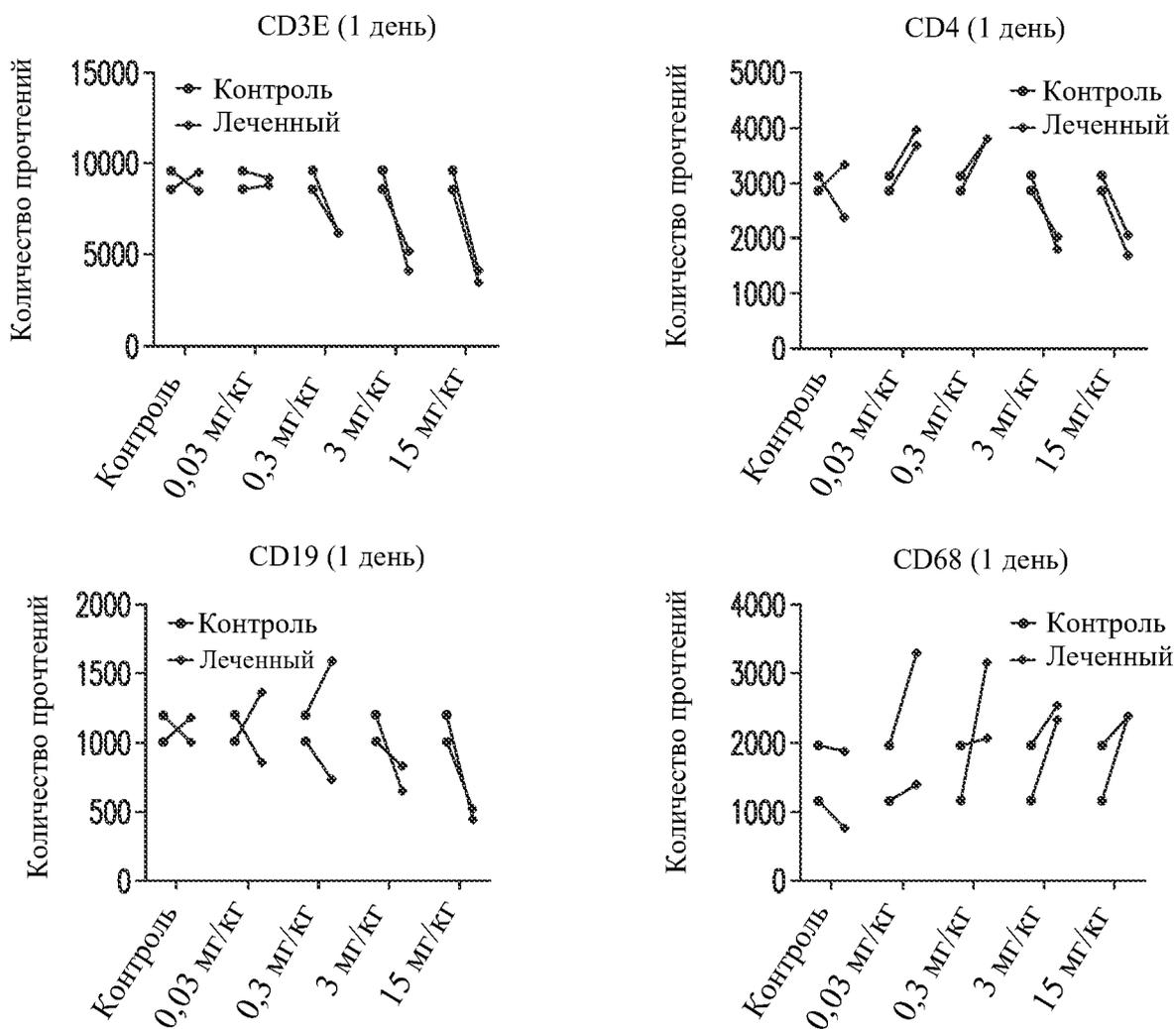
Общие 35 генов



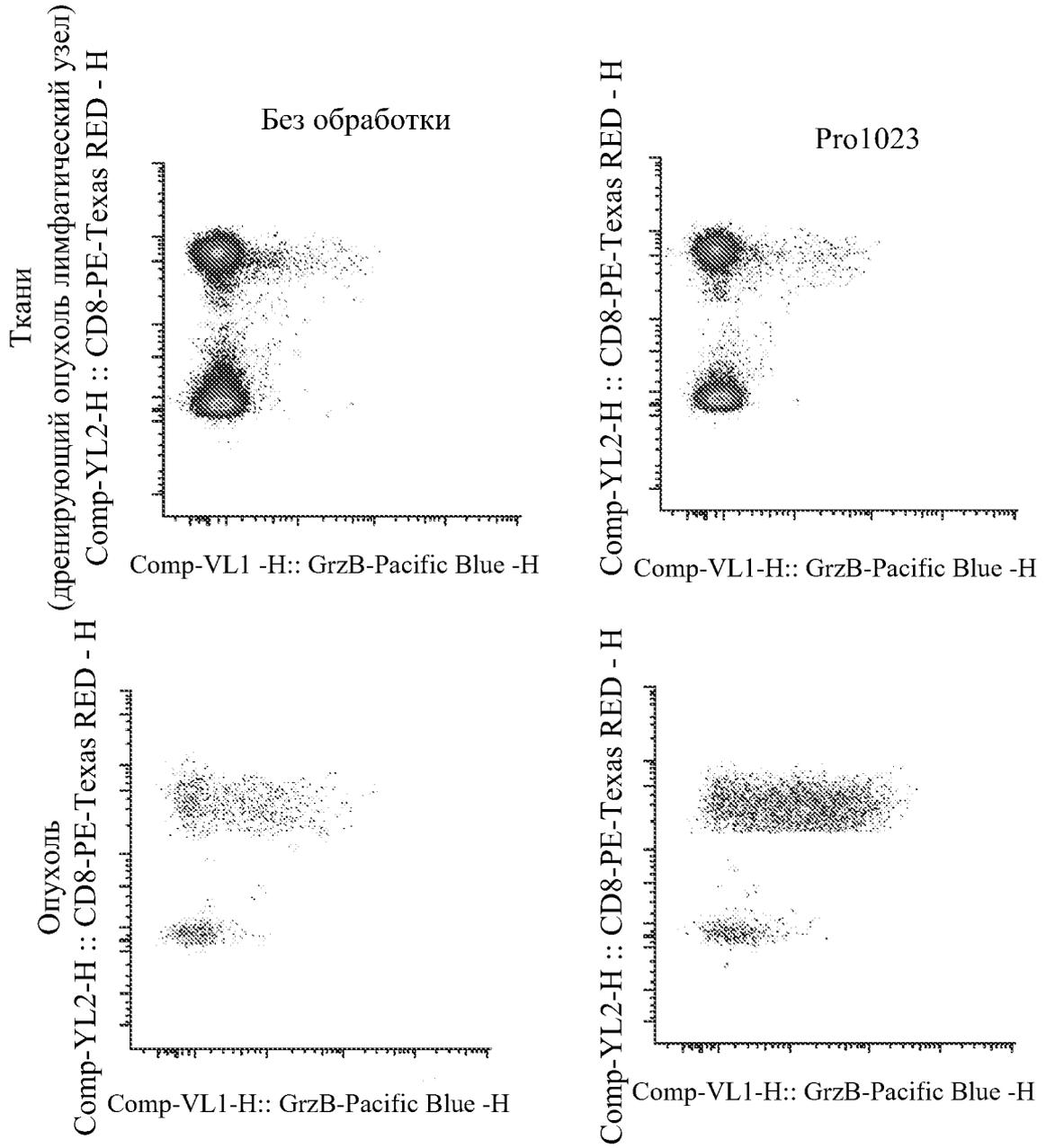
ФИГ. 43



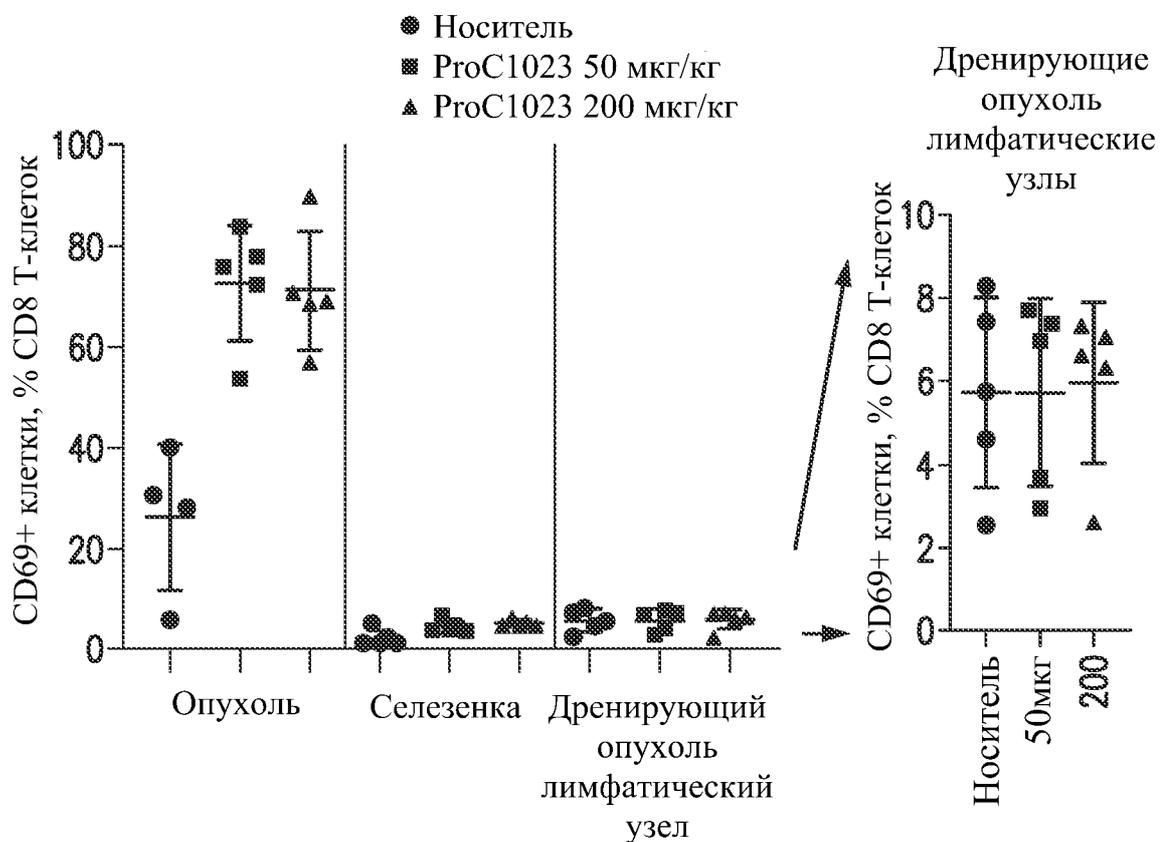
ФИГ. 44



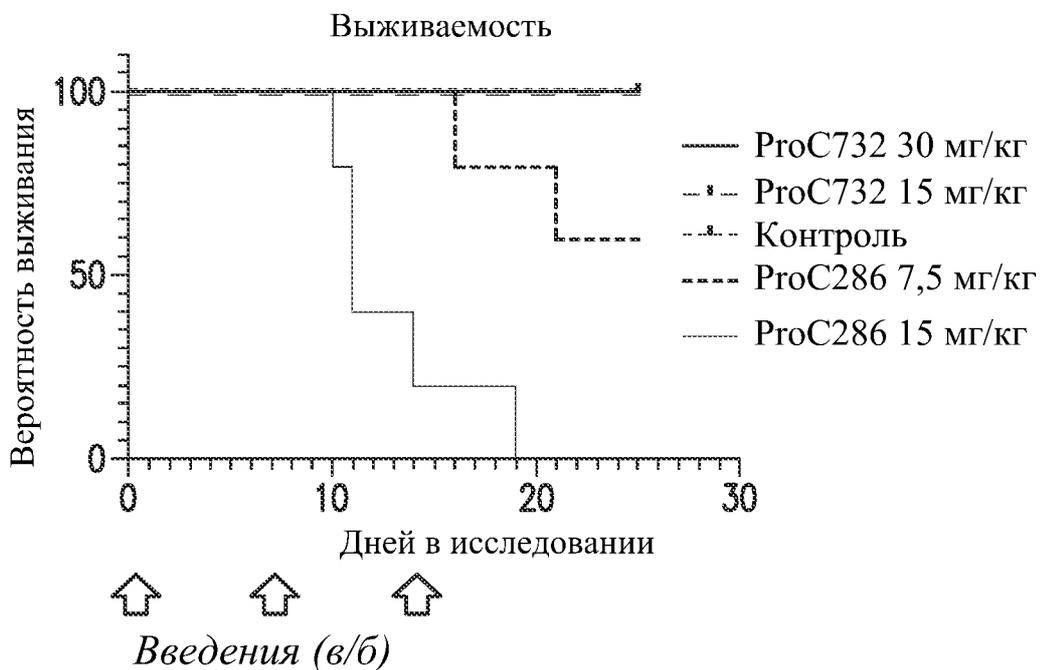
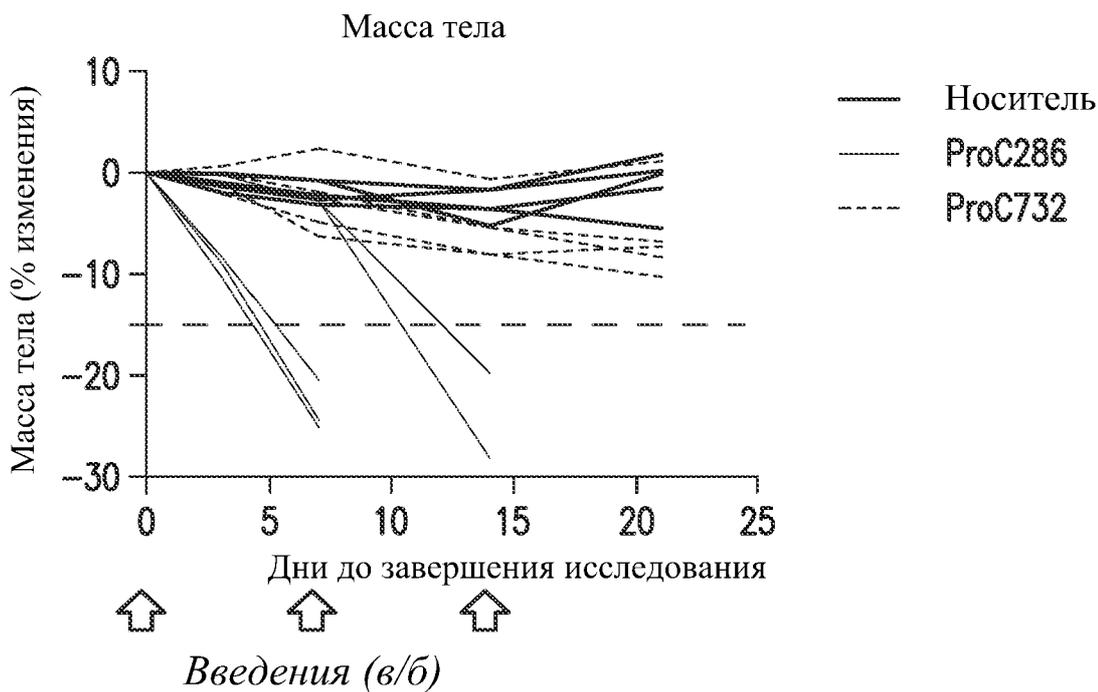
ФИГ. 44 (продолжение)



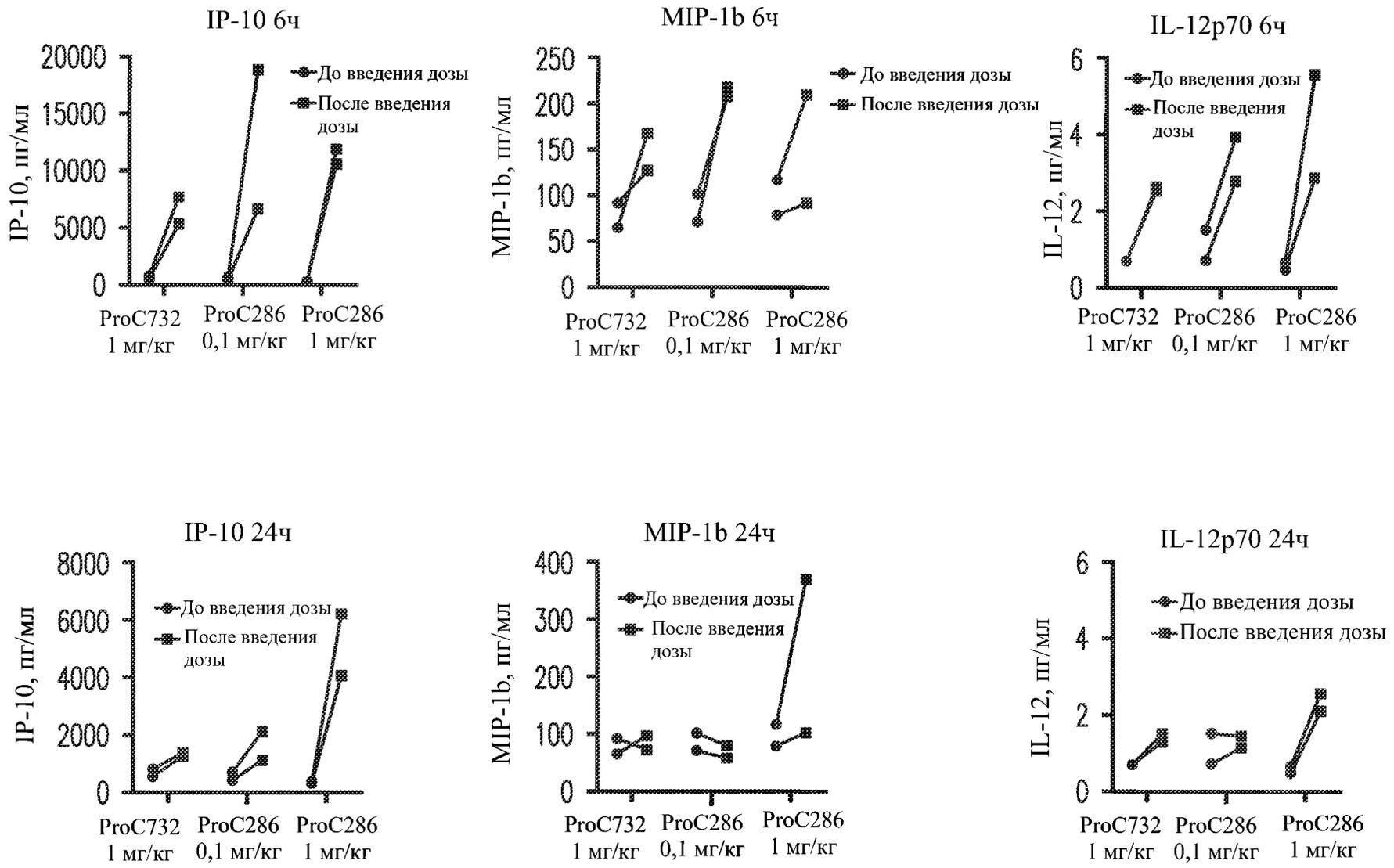
ФИГ. 45



ФИГ. 45 (продолжение)



ФИГ. 46



ФИГ. 47