

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490675 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.07.08

(51) Int. Cl. C07K 14/54 (2006.01)  
A61K 38/20 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.10.06

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

(31) 63/253,939; 63/311,397

(32) 2021.10.08; 2022.02.17

(33) US

(86) PCT/US2022/077644

(87) WO 2023/060156 2023.04.13

(88) 2023.05.19

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

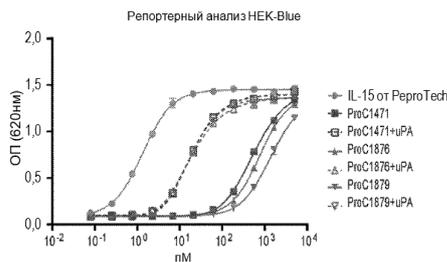
(72) Изобретатель:

Цай На, Уинтер Майкл Б., Пайдхунгат  
Мадан М., Дэниел Дилан Л., Ле  
Сколан Эрван (US)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В данном изобретении предложены активируемые цитокиновые конструкции, которые включают: (а) первую мономерную конструкцию, содержащую первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1), где CM1 расположен между CP1 и DD1; и (b) 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 CM1 и CM2 функционирует в качестве субстрат для протеазы; 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

202490675

202490675

A1

**АКТИВИРУЕМЫЕ ЦИТОКИНОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ  
КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ  
ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Настоящая заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США № 63/253939, поданной 8 октября 2021 г., и предварительной заявке на патент США № 63/311397, поданной 17 февраля 2022 г. Полное содержание представленных выше заявок тем самым в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

**ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

Содержимое электронного перечня последовательностей (CUTX087.xml; размер: 360448 байт; и дата создания: 29 сентября 2022 г.) полностью включено в данный документ посредством ссылки.

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, а более конкретно, к активируемым цитокиновым конструкциям, включая активируемые цитокиновые конструкции на основе интерлейкина-15 (IL-15).

**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. Интерлейкины представляют собой 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 меланомы, 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.

Известно, что интерлейкин-15 (IL-15) способствует дифференцировке и экспансии

Т-клеток, В-клеток и натуральных клеток-киллеров (NK), что приводит к усилению противоопухолевого ответа. IL-15 был признан перспективным кандидатом для противораковой терапии и прошел многочисленные клинические испытания. Несмотря на эту перспективность, IL-15, как известно, проявляет нежелательные провоспалительные эффекты и связан с патогенезом ряда аутоиммунных заболеваний. Максимально переносимая доза рекомбинантного IL-15 составляет 2 мг/кг. Рекомбинантный растворимый IL-15 также имеет короткий период полужизни *in vivo*, что затрудняет его применение в качестве терапевтического средства. Другие интерлейкины, такие как IL-6, IL-7, IL-12 и IL-21, среди прочих, также являются потенциальными средствами лечения злокачественных новообразований и других заболеваний. Однако, интерлейкиновая терапия часто сопровождается нежелательными побочными эффектами, в том числе гриппоподобными симптомами, тошнотой, рвотой, диареей, низким кровяным давлением и аритмией.

Интерфероны представляют собой еще один подкласс 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 пегилированного IFN $\alpha$  привела к ЧОО 60,5%. Комбинированное лечение также было связано с 49% нежелательных явлений G3/G4,

которые требовали снижения дозы пегилированного IFN $\alpha$  (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.

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**

Настоящее изобретение относится к активируемым цитокиновым конструкциям (АСС), которые включают: (а) первый мономер, содержащий первый зрелый белок-цитокин (СР1), первый расщепляемый фрагмент (СМ1) и первый домен димеризации (DD1), где СМ1 расположен между СР1 и DD1; и (b) второй мономер, содержащий второй зрелый белок-цитокин (СР2), второй расщепляемый фрагмент (СМ2), и второй домен димеризации (DD2), где СМ2 расположен между СР2 и DD2, где: СМ1 и СМ2 функционирует в качестве субстрат для протеазы; DD1 и DD2 связывают друг друга; и где АСС характеризуется снижением по меньшей мере одной активности СР1 и/или СР2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности СР1 и/или СР2. Протеазы(-а), расщепляющие СМ1 и СМ2, могут иметь повышенную экспрессию в пораженной ткани (например, опухолевой ткани) по сравнению со здоровой тканью. АСС может активироваться при расщеплении СМ1 и/или СМ2 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 предложены активируемые цитокиновые конструкции (АСС), которые включают первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, где: (а) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый белок-цитокин (СР1), первый расщепляемый фрагмент (СМ1), и первый домен димеризации (DD1), где СМ1 расположен между СР1 и DD1; и (b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый белок-цитокин (СР2), второй расщепляемый фрагмент (СМ2) и второй домен

димеризации (DD2), при этом CM2 расположен между CP2 и DD2; при этом DD1 и DD2 связываются друг с другом, образуя димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и при этом ACC 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.

Настоящее изобретение относится к активируемым цитокиновым конструкциям (ACC), которые включают: (a) первый мономер, содержащий первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый домен димеризации (DD1); и (b) второй мономер, содержащий второй зрелый белок-цитокин (CP2), расщепляемый фрагмент (CM) и второй домен димеризации (DD2), при этом CM расположен между CP2 и DD2, где: CM функционирует 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.

Настоящее изобретение относится к активируемым цитокиновым конструкциям (ACC), которые включают: (a) первый мономер, содержащий первый зрелый белок-цитокин (CP1), расщепляемый фрагмент (CM), и первый домен димеризации (DD1), при этом CM расположен между CP1 и DD1; и (b) второй мономер, содержащий второй зрелый белок-цитокин (CP2) и второй домен димеризации (DD2), где: CM функционирует 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.

Настоящее изобретение относится к активируемым цитокиновым конструкциям (ACC), которые включают: (a) первый мономер, содержащий первый зрелый белок-цитокин (CP1) и первый домен димеризации (DD1); и (b) второй мономер, содержащий второй зрелый белок-цитокин (CP2), и второй домен димеризации (DD2), где CP1, CP2 или как CP1, так и CP2 включает(-ют) аминокислотную последовательность, которая функционирует 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.

В некоторых вариантах осуществления CP1 содержит полипептид интерлейкина и/или CP2 содержит полипептид интерлейкина. В некоторых вариантах осуществления ACC характеризуется сниженным уровнем активности интерлейкина по сравнению с соответствующим контрольным интерлейкином. Например, в некоторых вариантах осуществления контрольный интерлейкин может содержать рекомбинантный белок

интерлейкин или пегилированный белок интерлейкина. В некоторых вариантах осуществления полипептид интерлейкина представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат IL-15.

В некоторых вариантах осуществления первый мономер, содержащий первый зрелый белок-цитокин (CP1), и/или второй мономер, содержащий второй зрелый белок-цитокин (CP2), дополнительно содержит пептидную маску (PM). В некоторых вариантах осуществления АСС дополнительно содержит СМ между РМ и СР.

В некоторых вариантах осуществления 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 (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; 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 первая мономерная конструкция содержит первый полипептид, который содержит CP1, CM1 и DD1. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, который содержит CP2, CM2 и DD2. 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 $\alpha$ ) и растворимого IL-15; барназы и барнстара; протеинкиназы A (PKA) и якорного белка A-киназы (AKAP); модулей адаптера / стыковочной метки на основе мутированных фрагментов PHКазы I; эпитопа и однодоменного антитела (sdAb); эпитопа и одноцепочечного переменного фрагмента (scFv); и модулей растворимых, чувствительных к N-этилмалеимиду рецепторов стыковочных белков (SNARE), основанных на взаимодействии белков синтаксина, синаптотагмина, 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 домены Fc человека содержат 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 каждый из доменов Fc человека содержит SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 являются одними и теми же. Например, DD1 и DD2 могут представлять собой пару идентичных доменов Fc IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления домены димеризации имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 315 и 316, соответственно. 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 варибельный 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 (также упоминается в данном документе как «сигнальная последовательность»). В некоторых вариантах осуществления каждый из CP1 и/или CP2 по отдельности выбран из группы, состоящей из: интерферона, интерлейкина, GM-CSF, G-CSF, LIF, OSM, CD154, LT- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, Epo, Тро, Flt-3L, SCF, M-CSF, и MSP.

CP1 и/или CP2 могут представлять собой последовательность дикого типа человека или животного, отличного от человека, мутантную последовательность, укороченную последовательность, гибридную последовательность или последовательность, содержащую вставки. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 являются одними и теми же. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 различаются, и данное описание включает выбор и комбинацию любых двух белков-цитокинов, приведенных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 представляет собой интерлейкин. В некоторых вариантах осуществления как CP1, так и CP2 представляют собой интерлейкин. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 представляют собой разные интерлейкины. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 представляют собой один и тот же интерлейкин. В некоторых вариантах осуществления CP1 или CP2 представляет собой интерлейкин. В некоторых вариантах осуществления один из CP1 и CP2 представляет собой интерлейкин, а другой из CP1 или CP2 представляет собой цитокин, отличный от интерлейкина. В некоторых аспектах один или оба цитокина представляют собой мономерные цитокины. В некоторых аспектах один или оба интерферона представляют собой мономерный интерлейкин. В некоторых аспектах CP1 или CP2 представляет собой мономерный интерлейкин, а другой CP1 или CP2 представляет собой другой цитокин. В некоторых вариантах осуществления каждый из CP1 и/или CP2 по отдельности выбран из группы, состоящей из IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат IL-15. 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 интерлейкин(-ы) представляет собой зрелый интерлейкин человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления интерлейкин(-

ы) может представлять собой IL-15. В некоторых вариантах осуществления как CP1, так и CP2 представляют собой IL-15. В некоторых вариантах осуществления как CP1, так и CP2 представляют собой зрелый IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления как CP1, так и CP2 содержат аминокислотную последовательность, полученную из зрелого IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления IL-15 может быть укороченным. В некоторых вариантах осуществления IL-15 содержит аминокислоты 49–161 IL-15 человека (SEQ ID NO: 347). В некоторых вариантах осуществления IL-15 содержит аминокислоты 49–162 IL-15 человека (SEQ ID NO: 348). В некоторых вариантах осуществления интерлейкин(-ы) представляют собой мутантный интерлейкин. В некоторых вариантах осуществления интерлейкин(-ы) представляет собой мутантный интерлейкин, в котором сайт расщепления эндогенной протеазой стал дисфункциональным в результате замены, удаления или вставки одной или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления интерлейкин(-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 CP1 и/или CP2 содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 347. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 347. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат последовательность SEQ ID NO: 347. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит интерлейкин. В некоторых вариантах осуществления интерлейкин выбран из группы, состоящей из IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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 интерлейкин выбран из группы, состоящей из IL-2 и IL-15.

В некоторых вариантах осуществления каждый из CM1 и/или CM2 содержит в общей сложности от около 3 до около 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 содержат субстраты для разных протеаз. В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 имеют одинаковую длину и содержат одну и ту же аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 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 В, катепсина С, катепсина К, 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 С, катепсина А, катепсина G, химазы, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, эластазы, гранзима В, 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. В некоторых вариантах осуществления 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.

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), VHMPLGFLGP (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), 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), 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), SGRSDNI (SEQ ID NO: 100), и LSGRSNI (SEQ ID NO: 349). 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), ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 41), и LSGRSNI (SEQ ID NO: 349). В некоторых вариантах осуществления CM содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SGRSDNI (SEQ ID NO: 100), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 41), и LSGRSNI (SEQ ID NO: 349). 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 и SEQ ID NO: 349. 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 и SEQ ID NO: 349. 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 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 в шарнирной области при чтении в направлении от N- к C-концу (например, цистеин 226 человеческого IgG1, 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 N-концевые последовательности EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 387), ERK, ELKTP LGDTTHT (SEQ ID NO: 388), или ESKYGPP (SEQ ID NO: 389) удалены.

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 CP1 и CM1, и/или линкер L2, расположенный между CM1 и DD1. 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 CP2 и CM2, и/или линкер L4, расположенный между CM2 и DD2. 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 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 контексте данного документа термин «линкер» относится к пептиду, аминокислотная последовательность которого не является субстратом для протеазы.

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер, причем каждый линкер независимо выбран из группы, состоящей из одного глицина (G); двух остатков глицина (GG); GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 210); GGGG (SEQ ID NO: 2); GGGSGGGG (SEQ ID NO: 211); GGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO: 212); GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 213); GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 214); GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 215); GGGG (SEQ ID NO: 216); GS; GGGSGS (SEQ ID NO: 217); GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 218); GGS LDPKGGGG (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); (GS)<sub>n</sub>, (GG)<sub>n</sub>, (GSGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 227), (GGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 228), (GGGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 216), где каждый n представляет собой целое число, равное по меньшей мере единице; GSGG (SEQ ID NO: 229); GGS GG (SEQ ID NO: 230); GSGSG (SEQ ID NO: 231); GSGGG (SEQ ID NO: 232); GGGSG (SEQ ID NO: 233); GSSSG (SEQ ID NO: 234); GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 213); GGGGSGGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 235); и GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит последовательность GGGG (SEQ ID NO: 2).

В контексте данного документа термин «спейсер» относится к аминокислотному остатку или пептиду, включенному в свободный конец зрелого ACC, например, между сигнальным пептидом и N-концом зрелого ACC. 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 содержать или состоять из любой из следующих иллюстративных аминокислотных последовательностей: QGQSGS (SEQ ID NO:375); GQSGS (SEQ ID NO:376); QSGS (SEQ ID NO: 377); SGS; GS; S; QGQSGQG (SEQ ID NO: 378); GQSGQG (SEQ ID NO: 379); QSGQG (SEQ ID NO: 380); SGQG (SEQ ID NO: 381); GQG; QG; G; QGQSGQ (SEQ ID NO: 382); GQSGQ (SEQ ID NO: 383); QSGQ (SEQ ID NO: 384); QGQSG (SEQ ID NO: 385); QGQS (SEQ ID NO: 386); SGQ; GQ; и Q. В некоторых вариантах осуществления спейсерные последовательности могут отсутствовать.

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит в направлении от N-конца к C-концу необязательный PM1, необязательный CM3, CP1, CM1 и, связанные прямо или опосредованно с C-концом CM1, DD1. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит в направлении от C-конца к N-концу необязательный PM1, необязательный 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 необязательный PM2, необязательный CM4, CP2, CM2 и DD2, связанный прямо или опосредованно с C-концом CM2. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит в направлении от C-конца к N-концу CP2, CM2, и DD2, прямо или опосредованный 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 в шарнирной области при чтении в направлении от N-конца к C-концу (например, цистеин 226 человеческого IgG1 или IgG4, с использованием нумерации EU), и где CM1 и любой линкер(-ы), которые расположены между CP1 и N-концевым цистеином DD1, имеют общую длину не более 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 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 в шарнирной области при чтении в направлении от N-конца к C-концу (например, цистеин 226 человеческого IgG1 или IgG4, с использованием нумерации EU), и где CM2 и любой линкер(-ы), которые расположены между CP2 и N-концевым цистеином DD2, имеют

общую длину не более 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислот, предпочтительно не более 10 аминокислот, предпочтительно не более 8 аминокислот, особенно предпочтительно не более 7 аминокислот.

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: 350. В некоторых вариантах осуществления АСС представляет собой гомодимер, в котором первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция идентичны и содержат аминокислоты 21–359 SEQ ID NO: 350. В некоторых вариантах осуществления АСС представляет собой гомодимер, в котором первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция идентичны и содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 350, SEQ ID NO: 351, SEQ ID NO: 352, SEQ ID NO: 353, SEQ ID NO: 354, SEQ ID NO: 355, и SEQ ID NO: 356. В некоторых вариантах осуществления каждая первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция содержат аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотами 21–359 SEQ ID NO: 350. В некоторых вариантах осуществления каждая первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция содержат аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 350, аминокислот 21–359 SEQ ID NO: 350, SEQ ID NO: 351, SEQ ID NO: 352, SEQ ID NO: 353, SEQ ID NO: 354, SEQ ID NO: 355, и SEQ ID NO: 356. 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: 347. В некоторых вариантах осуществления каждая первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция содержат в направлении от N-конца к C-концу SEQ ID NO: 347; СМ, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 100, и SEQ ID NO: 349; и домен димеризации. В некоторых вариантах осуществления каждая первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция содержат в направлении от N-конца к C-концу необязательную пептидную маску, которая специфически связывает IL-15 человека; необязательный СМ3; СР1, содержащий аминокислотную последовательность IL-15 человека; СМ1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5–100 и SEQ ID NO: 349; и домен Fc IgG человека. В некоторых вариантах осуществления

каждая первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция содержат в направлении от N-конца к C-концу необязательную пептидную маску, которая специфически связывает IL-15 человека; необязательный CM3; SEQ ID NO: 347; CM, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 100, и SEQ ID NO: 349; и домен Fc IgG человека. В некоторых вариантах осуществления CP1 представляет собой IL-15, а ACC содержит пептидную маску, содержащую аминокислотную последовательность, полученную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 358 – 374. В некоторых вариантах осуществления CP1 представляет собой IL-15, а ACC содержит пептидную маску, состоящую не более чем из 40 аминокислот, полученных из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 358 – 374.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность CP1 и/или CP2 представляет собой аффинность связывания ( $K_D$ ) CP1 и/или CP2 с его когнатным рецептором по данным поверхностного плазмонного резонанса. Например, если CP1 или CP2 представляет собой интерлейкин, когнатным рецептором может быть рецептор интерлейкина, например, содержащий CD25 (IL-2R $\alpha$ ), CD122 (IL-2R $\beta$ ) и CD132 (IL-2R $\gamma$ ). 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, например, клетке лимфомы или клетке НЕК. В некоторых вариантах осуществления ACC (до воздействия протеаз) характеризуется по меньшей мере 2-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления ACC характеризуется по меньшей мере 5-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления ACC характеризуется по меньшей мере 10-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и CP2 по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления ACC характеризуется уменьшением в по меньшей мере 20 раз, 50 раз, 100 раз, 200 раз, 300 раз, 400 раз, 500 раз, 600 раз, 700 раз, 800 раз, 900 раз, 1000 раз, 1100 раз, 1200 раз, 1300 раз, 1400 раз, 1500 раз, 1600 раз, 1700 раз, 1800 раз, 1900 раз, 2000 раз по меньшей мере в одной активности CP1 и/или 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 (продукта расщепления) к EC50 (контрольный уровень для белка 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 около 3, или менее около 2, или менее около 1,5, или равен около 1. В некоторых вариантах осуществления EC50 продукта расщепления примерно такая же, как EC50 зрелого цитокина дикого типа, демонстрируя, что после расщепления активность CP1 и/или CP2 полностью восстанавливается или почти полностью восстанавливается. В некоторых вариантах осуществления соотношение EC50 продукта расщепления к EC50 контроля дикого типа составляет от около 1 до около 10, или от около 2 до около 8, или от около 3 до около 7, или от около 4 до около 6, что указывает на хорошее восстановление активности цитокинов после протеазной активации. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 представляют собой IL-15, а АСС характеризуется наличием продукта расщепления после протеазной активации, где соотношение EC50 продукта расщепления к EC50 рекомбинантного IL-15 составляет от 1 до около 10, или от около 2 до около 8, или от около 3 до около 7, или от около 4 до около 6, или от около 5 до около 7 или около 6, как измерено на клетках НЕК293, чувствительных к IL-2/IL-15.

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 СР1 и СМ1 любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит любой из DD1, описанных в данном документе. В данном документе также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, который содержит СР2 и СМ2 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. 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 некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, содержат полинуклеотид согласно SEQ ID NO: 357.

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. 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 настоящее изобретение предлагает 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, будет иметь преимущественную силу.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания и графических материалов, 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  $\pm 5\%$ , в соответствующих случаях, находятся в пределах предполагаемого значения указанной величины.

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 С-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 С-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 замещения представляют собой такие замещения, в которых аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники. 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, аспартат, 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 алифатических аминокислот (например, аланин, валин, лейцин и изолейцин), 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, а целью является ослабление по меньшей мере одного симптома злокачественного новообразования.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

НаФиг. 1А представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерную конструкцию, которые связываются друг с другом либо ковалентно, либо нековалентно через первый и второй домены димеризации DD1 140 и DD2 190, соответственно. Первая мономерная конструкция

содержит от N-конца к С-концу первый зрелый белок-цитокин CP1 **100**, первый необязательный линкер **110**, первый расщепляемый фрагмент CM1 **120**, второй необязательный линкер **130** и первый домен димеризации DD1 **140**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй зрелый белок-цитокин CP2 **150**, третий необязательный линкер **160**, второй расщепляемый фрагмент CM2 **170**, четвертый необязательный линкер **180** и второй домен димеризации DD2 **190**.

На **Фиг. 1В** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерную конструкцию, которые связываются друг с другом либо ковалентно, либо нековалентно через первый и второй домены димеризации DD1 **200** и DD2 **250**, соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый домен димеризации DD1 **200**, второй необязательный линкер **210**, первый расщепляемый фрагмент CM1 **220**, первый необязательный линкер **230** и первый зрелый белок-цитокин CP1 **240**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй домен димеризации DD2 **250**, четвертый необязательный линкер **260**, второй расщепляемый фрагмент CM2 **270**, третий необязательный линкер **280** и второй зрелый белок-цитокин CP2 **290**.

На **Фиг. 1С** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей от N-конца к С-концу: (1) первую мономерную конструкцию **110**, имеющую необязательную PM1 **119**, необязательную CM3 **117**, CP1 **115**, CM1 **113** и DD1 **111**, и; (2) вторую мономерную конструкцию **120**, имеющую необязательный PM2 **129**, необязательный 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**. АСС 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.

На **Фиг. 2А** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерную конструкцию, которые связываются друг с другом нековалентно через первый и второй домены димеризации DD1 **340** и DD2 **390**, соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый зрелый белок-цитокин CP1 **300**, первый необязательный линкер **310**, первый расщепляемый фрагмент CM1 **320**, второй необязательный линкер **330** и первый домен димеризации DD1 **340**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй зрелый белок-цитокин CP2 **350**, третий необязательный линкер **360**, второй

расщепляемый фрагмент СМ2 **370**, четвертый необязательный линкер **380** и второй домен димеризации DD2 **390**.

На **Фиг. 2В** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерную конструкцию, которые связываются друг с другом нековалентно через первый и второй домены димеризации DD1 **400** и DD2 **450**, соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый домен димеризации DD1 **400**, второй необязательный линкер **410**, первый расщепляемый фрагмент СМ1 **420**, первый необязательный линкер **430** и первый зрелый белок-цитокин СР1 **440**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй домен димеризации DD2 **450**, четвертый необязательный линкер **460**, второй расщепляемый фрагмент СМ2 **470**, третий необязательный линкер **480** и второй зрелый белок-цитокин СР2 **490**.

На **Фиг. 3** показана последовательность маскированной цитокиновой конструкции ProC1471 с необязательной сигнальной последовательностью, выделенной курсивом, подчеркнутой последовательностью зрелого IL-15 (аминокислоты 49–161), и последовательностью расщепляемого фрагмента (СМ), выделенной жирным шрифтом.

На **Фиг. 4** показана активность ProC1471 по сравнению с рекомбинантным IL-15, протестированная *in vitro* с использованием чувствительных к IL-2/IL-15 клеток HEK293.

На **Фиг. 5** показана активация ProC1471 протеазами uPA и MT-SP1.

На **Фиг. 6** показана активность активируемого протеазой ProC1471 по сравнению с неактивированным ProC1471 и рекомбинантным IL-15, как было протестировано *in vitro* с использованием IL-2/IL-15-чувствительных клеток HEK293.

На **Фиг. 7А** показано влияние длины гибкого линкера в слитой молекуле интерферон- $\alpha$ 2b-Fc на EC50, определенную с помощью репортерного анализа на основе клеток HEK293. На **Фиг. 7В** показано влияние длины связывающей области (LR) в слитой молекуле интерферон- $\alpha$ 2b-Fc на EC50, определенную с помощью репортерного анализа на основе клеток HEK293.

На **Фиг. 8А** показано влияние длины линкера в слитом белке интерферон- $\alpha$ 2b-Fc на EC50, определенную с помощью анализа апоптоза Daudi. На **Фиг. 8В** показано влияние длины связывающей области (LR) в слитой молекуле интерферон- $\alpha$ 2b-Fc на EC50, определенную с помощью анализа апоптоза Daudi.

На **Фиг. 9** представлены результаты репортерного анализа на основе клеток HEK293 для оценки активности ACC (IFN $\alpha$ 2b 1204DNIIdL NhG4); обработанной протеазой (активированной) ACC (IFN $\alpha$ -2b 1204DNIIdL NhG4 + uPA); Sylatron®; и рекомбинантного

исходного цитокина (IFNa2b). Результаты продемонстрировали, что после обработки АСС протеазой активность цитокина в АСС может быть восстановлена до уровня, сравнимого с уровнем рекомбинантного исходного цитокина.

На **Фиг. 10** показаны результаты анализа на основе клеток лимфомы Daudi для измерения антипролиферативной активности (вверху) и результаты репортерного анализа на основе клеток НЕК293 для измерения активности (внизу) АСС (ProC440), обработанной протеазой АСС (ProC440 + uPA) и IFNa2b от StemCell. Результаты продемонстрировали, что активность была снижена в 1000X раз при создании структуры АСС по настоящему изобретению, и после обработки АСС протеазой активность цитокина в АСС восстанавливалась до уровня, сравнимого с уровнем исходного рекомбинантного цитокина.

На **Фиг. 11А** изображена структура ProC440 и показано, что расщепление uPa в ожидаемом сайте в СМ было подтверждено масс-спектрометрическим анализом. Помимо чувствительности к активации uPa, ProC440 расщепляется MMP4. На **Фиг. 11В** показано, что анализ на основе масс-спектрометрии выявил сайт расщепления MMP14 в С-концевой области IFNa (в L161) рядом с расщепляемым фрагментом. Протеазная активация с помощью MMP14 восстанавливала активность до уровня, сравнимого с активностью рекомбинантного цитокина.

На **Фиг. 12А** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерную конструкцию, которые связываются друг с другом нековалентно через первый и второй домены димеризации DD1 **540** и DD2 **590**, соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый зрелый белок-цитокин CP1 **500**, первый необязательный линкер **510**, первый расщепляемый фрагмент CM1 **520**, второй необязательный линкер **530** и первый домен димеризации DD1 **540**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй зрелый белок-цитокин CP2 **550**, третий необязательный линкер **560** и второй домен димеризации DD2 **590**.

На **Фиг. 12В** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерную конструкцию, которые связываются друг с другом нековалентно через первый и второй домены димеризации DD1 **600** и DD2 **650**, соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый домен димеризации DD1 **600**, первый необязательный линкер **630** и первый зрелый белок-цитокин CP1 **640**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй домен димеризации DD2 **650**, второй необязательный линкер **660**, расщепляемый фрагмент CM **670**, третий необязательный линкер **680** и второй зрелый

белок-цитокин CP2 690.

На **Фиг. 13А** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерную конструкцию, которые связываются друг с другом нековалентно через первый и второй домены димеризации DD1 740 и DD2 790, соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый зрелый белок-цитокин CP 700, первый необязательный линкер 710, первый расщепляемый фрагмент CM1 720, второй необязательный линкер 730 и первый домен димеризации DD1 740. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу полипептид или белок, лишенный цитокиновой активности 780, и второй домен димеризации DD2 790. Полипептид или белок, лишенный цитокиновой активности 780, может, например, представлять собой укороченный белок-цитокин, лишенный цитокиновой активности мутированный белок-цитокин, лишенный цитокиновой активности, последовательность-«заглушку» или полипептидную последовательность, которая связывается с высокой аффинностью с CP 700 и снижает цитокиновую активность второго фрагмента по сравнению с контрольным уровнем второго фрагмента. DD1 740 и DD2 790 могут быть одинаковыми или разными.

На **Фиг. 13В** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерную конструкцию, которые связываются друг с другом нековалентно через первый и второй домены димеризации DD1 800 и DD2 850, соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый домен димеризации DD1 800 и полипептид или белок, который лишен цитокиновой активности 830. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй домен димеризации DD2 850, первый необязательный линкер 860, расщепляемый фрагмент CM 870, второй необязательный линкер 880 и зрелый белок-цитокин CP 890. Полипептид или белок, лишенный цитокиновой активности 830, может, например, представлять собой укороченный белок-цитокин, лишенный цитокиновой активности мутированный белок-цитокин, лишенный цитокиновой активности, последовательность-«заглушку» или полипептидную последовательность, которая связывается с высокой аффинностью с CP 700 и снижает цитокиновую активность второго фрагмента по сравнению с контрольным уровнем второго фрагмента. DD1 800 и DD2 850 могут быть одинаковыми или разными.

На **Фиг. 14** схематически показан вариант осуществления АСС, обозначающий его связывающую область (LR).

На **Фиг. 15** представлено изображение геля, загруженного: (1) АСС IFN $\alpha$ -2b-Fc

hIgG4 с расщепляемым фрагментом 1204 (1204); (2) продукт сериновой протеазы 1 мембранного типа (MT-SP1) и АСС IFN $\alpha$ -2b-Fc hIgG4 с расщепляемым фрагментом 1204 (1204 MT-SP1); (3) продукт АСС IFN $\alpha$ -2b-Fc hIgG4 с расщепляемым фрагментом 1204 и протеазой uPA (1204 uPA); (4) АСС IFN $\alpha$ -2b-Fc hIgG4 с расщепляемым фрагментом 1204, слитый с линкером из 5 аминокислот (1204 +1); (5) продукт IFN $\alpha$ -2b-Fc hIgG4 1204 + 1 и MT-SP1 (1204+1 MT-SP1); (6) АСС IFN $\alpha$ -2b-Fc hIgG4 с расщепляемым фрагментом 1490; (7) продукт MT-SP1 и АСС IFN $\alpha$ -2b-Fc hIgG4 с расщепляемым фрагментом 1490; продукт uPA и АСС IFN $\alpha$ -2b-Fc hIgG4 с расщепляемым фрагментом 1490 (uPA 1490).

На **Фиг. 16** представлены результаты репортерного анализа на основе клеток НЕК293 для оценки активности интерферона- $\alpha$ 2b Sylatron<sup>®</sup> (пэгинтерферон альфа-2b) и различных слитых молекул интерферона  $\alpha$ -2b (IFNa2b): IgG4 человека, слитый на N-конце с IFNa2b (IFNa2b NhG4); Человеческий IgG4, N-концевой слитый с IFNa2b через линкер из пяти аминокислот (IFNa2b 5AA NhG4); активируемой цитокиновой конструкции IFN- $\alpha$ 2b-1204dL-hIgG4 (IFNa2b 1204DNIdL NhG4); активируемой цитокиновой конструкции, которая включает те же компоненты, что и IFN- $\alpha$ 2b-1204dL-hIgG4, но которая также имеет линкер из 5 аминокислот, расположенный между белковым компонентом в виде зрелого цитокина и расщепляемым фрагментом (IFNa2b 5AA 1204DNIdL NhG4); и активируемой цитокиновой конструкции IFN- $\alpha$ 2b-1490DNI-hIgG4 (IFNa2b 1490DNI NhG4).

На **Фиг. 17А** показана структура ProC286 и активность ProC286 по сравнению с активностью Sylatron<sup>®</sup> в анализе апоптоза клеток Daudi. ProC286 и Sylatron<sup>®</sup> продемонстрировали сходные уровни активности, что указывает на то, что ProC286 можно использовать в качестве суррогатного контроля Sylatron<sup>®</sup> для оценки переносимости IFN $\alpha$ -2b в исследовании на хомяках. На **Фиг. 17В** изображена структура ProC291 и активность ProC291 по сравнению с активностью Sylatron<sup>®</sup> в анализе апоптоза клеток Daudi. ProC291 продемонстрировал значительно более низкую активность по сравнению с Sylatron<sup>®</sup> и ProC286.

На **Фиг. 18А-18С** показана потеря веса животных при введении доз по 2 мг/кг (**Фиг. 18А**), 10 мг/кг (**Фиг. 18В**) и 15 мг/кг (**Фиг. 18С**) контрольного hIgG4, ProC286 или ProC440 в течение периодов лечения у сирийских золотых хомяков.

На **Фиг. 19А-19С** показаны результаты клинических биохимических анализов (щелочная фосфатаза (ЩФ), **Фиг. 19А**; аланиновая трансаминаза (АЛТ), **Фиг. 19В**; и аспартат-трансаминаза (АСТ), **Фиг. 19С**) у сирийских золотых хомяков, которым вводили 2 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг контрольного hIgG4, ProC286 или ProC440.

На **Фиг. 20А-20С** показаны результаты гематологического анализа (количество

ретикулоцитов, Фиг. 20А; количество нейтрофилов, Фиг. 20В; и количество лейкоцитов (WBC), Фиг. 20С) у сирийских золотых хомяков, которым вводили 2 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг контрольного hIgG4, ProC286 или ProC440.

На **Фиг. 21А-21В** показана активация содержащей IL-15 АСС с помощью uPa. На **Фиг. 21А** показано расщепление различных содержащих IL-15 АСС с помощью uPa методом электрофореза. На **Фиг. 21В** показана активность активируемых протеазой содержащих IL-15 АСС по сравнению с неактивированными содержащими IL-15 АСС в репортерном анализе на основе клеток НЕК-Blue.

На **Фиг. 22** показана активность активируемых протеазой содержащих IL-15 АСС по сравнению с неактивированными содержащими IL-15 АСС в анализе пролиферации РВМС человека на основе процентной экспрессии Ki67.

На **Фиг. 23** показана активность активируемых протеазой содержащих IL-15 АСС по сравнению с неактивированными содержащими IL-15 АСС в анализе фосфорилирования STAT5 РВМС 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 (TMDD) 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. Данная цитокиновая конструкция локализует 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 с удивлением обнаружили, что димеризация первой и второй мономерных конструкций обеспечивает высокое снижение активности цитокинов, особенно более высокое, чем при присоединении одного цитокина к домену димеризации. См. **Фиг. 4**.

Кроме того, изобретатели обнаружили, что степень снижения активности цитокинов можно регулировать путем изменения длины гибкого линкера или длины связывающей области. Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что снижение активности цитокинов примерно в 1000 раз или более может быть достигнуто путем присоединения цитокина через короткую расщепляемую протеазой последовательность к стерически ограниченному домену димеризации (таком как домен Fc человеческого IgG, который укорочен по первому цистеину в шарнирной области, например, Cys226, согласно нумерации EU). Удивительно, но протеазное расщепление происходит, несмотря на

стерические ограничения, и полная активность цитокина восстанавливается после отщепления цитокина от домена димеризации.

Авторы изобретения обнаружили, что цитокиновая активность IL-15 может быть снижена примерно в 1000 раз и по меньшей мере в 250 раз путем присоединения цитокина IL-15 через короткую расщепляемую протеазой последовательность к стерически ограниченному домену димеризации, такому как домен Fc человеческого IgG, например, домен Fc человеческого IgG4, который был укорочен по первому цистеину в шарнирной области, например, Cys226, согласно нумерации EU. Кроме того, цитокиновая активность IL-15 может быть восстановлена до того же уровня или почти до того же уровня, что и у стандартного рекомбинантного IL-15, после отщепления цитокина IL-15 от домена димеризации. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая активность IL-15 увеличивается по меньшей мере в 50 раз при отщеплении IL-15 от домена димеризации. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая активность IL-15 увеличивается по меньшей мере в 60 раз при отщеплении IL-15 от домена димеризации.

Предварительная заявка США № 63/008542, поданная 10 апреля 2020 г., в которой описаны некоторые активируемые цитокиновые конструкции, включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Все содержимое предварительных заявок США №№ 63/161889 и 63/161913, поданных 16 марта 2021 г., а также предварительных заявок США №№ 63/164827 и 63/164849, поданных 23 марта 2021 г., которые описывают определенные активируемые цитокиновые конструкции, также включены в данный документ посредством ссылки.

### **Активируемые цитокиновые конструкции**

Активируемые цитокиновые конструкции по настоящему изобретению представляют собой димерные комплексы, содержащие первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию. Димеризации мономерных компонентов способствует пара доменов димеризации. В одном аспекте каждая мономерная конструкция включает белок-цитокин, расщепляемый фрагмент и домен димеризации (DD). В другом аспекте одна мономерная конструкция включает белок-цитокин, расщепляемый фрагмент и DD, тогда как другая мономерная конструкция включает белок-цитокин и DD, но не расщепляемый фрагмент. В одном аспекте одна мономерная конструкция включает белок-цитокин, расщепляемый фрагмент и DD, тогда как другая мономерная конструкция включает белок или пептид, который лишен цитокиновой активности и DD, но не расщепляемый фрагмент. В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении предложена активируемая цитокиновая конструкция (ACC), которая включает первую мономерную

конструкцию и вторую мономерную конструкцию, где:

(a) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1),

при этом CM1 расположен между CP1 и DD1; 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; 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 конкретном варианте осуществления каждый из CP1 и CP2 содержит полипептид интерлейкина. В одном варианте осуществления полипептид интерлейкина выбран из группы, состоящей из IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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-15, IL-16, и IL-17. В другом варианте осуществления изобретения полипептид интерлейкина представляет собой IL-15, тем самым содержащий активируемую конструкцию IL-15. В одном аспекте активируемая конструкция IL-15 имеет сниженную активность по сравнению с рекомбинантным IL15.

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 обоих 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. 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.

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, которые подходят для применения в качестве СМ1 и/или СМ2, включают любые субстраты протеаз, известные в данной области техники. Иллюстративные расщепляемые фрагменты описаны более подробно ниже.

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.

Термины «пептидная маска» и «PM» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения аминокислотной последовательности из менее чем 50 аминокислот, которая снижает или ингибирует одну или более активностей белка-цитокина. PM может связываться с цитокином и ограничивать взаимодействие цитокина с его рецептором. В некоторых вариантах осуществления PM имеет длину не более 40 аминокислот. В предпочтительных вариантах осуществления длина PM составляет не более 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления PM имеет длину не более 19, 18, 17, 16 или 15 аминокислот.

В контексте данного документа термин «эффективность маскирования» относится к активности (например, EC50) нерасщепленной АСС, деленной на активность контрольного цитокина, где контрольный цитокин может быть либо продуктом расщепления АСС, либо цитокином, используемым в качестве CP АСС. АСС, имеющий пониженный уровень по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2, 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 некоторых вариантах осуществления, где CP1 и/или CP2 представляют собой полипептид IL-15, АСС может иметь эффективность маскирования, которая составляет от около 10 до около 100, или от около 10 до около 200, или от около 50 до около 150, или от около 50 до около 80, в соответствии с измеренным соотношением EC50 нерасщепленной

АСС к ЕС50 продукта расщепления АСС на IL-2/IL-15-чувствительных клетках НЕК293.

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 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, и DD1 могут быть одинаковыми или разными по сравнению с соответствующими CP2, CM2, и DD2 с точки зрения, например, молекулярной массы, размера, аминокислотной последовательности компонентов CP и CM (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-конца к C-концу компоненты CP и CM, CP1, CM1 и DD1, прямо или опосредованно (через линкер) связанный с C-концом CM1. В других вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит от C-конца к N-концу компоненты CP и CM: CP1, CM1, и DD1, прямо или опосредованно (через линкер) связанный с N-концом CM1. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к C-конца компоненты CP и CM, CP2, CM2 и DD2, прямо или опосредованно (через линкер) связанный с C-концом CM2. В других вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит от C-конца до N-концу компоненты CP и CM, CP2, CM2 и DD2,

прямо или опосредованно (через линкер) связанный с N-концом СМ2.

В некоторых вариантах осуществления первый мономер, содержащий первый зрелый белок-цитокин (СР1), и/или второй мономер, содержащий второй зрелый белок-цитокин (СР2), дополнительно содержит пептидную маску (РМ). В некоторых вариантах осуществления АСС дополнительно содержит СМ между РМ и СР.

В некоторых вариантах осуществления активируемые цитокиновые конструкции (АСС), которые включают 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 расщепляемый фрагмент (СМ1 и СМ3) и первый домен димеризации (DD1), где СМ1 расположен между СР1 и DD1, а СМ3 расположен между РМ1 и СР1; и (b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый белок-цитокин (СР2), второй расщепляемый фрагмент (СМ2) и второй домен димеризации (DD2), где СМ2 расположен между СР2 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 СР1 и/или СР2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной активности СР1 и/или СР2.

В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция дополнительно содержит вторую пептидную маску (РМ2) и четвертый расщепляемый фрагмент (СМ4), где СМ4 расположен между РМ2 и СР2. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит первый полипептид, который содержит РМ1, СМ3, СР1, СМ1 и DD1. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, который содержит СР2, СМ2 и DD2. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, содержащий РМ2, СМ4, СР2, СМ2 и DD2.

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 привела к существенному восстановлению цитокиновой

активности. Полученные результаты свидетельствуют о том, что конформация цитокиновых компонентов не была необратимо изменена в контексте АСС.

В некоторых вариантах осуществления, когда СР соединен с РМ и в присутствии природного партнера по связыванию СР, связывание СР с партнером по связыванию отсутствует или по существу отсутствует, или связывание СР 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 СР, не связанного с РМ, 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, анализ эффективности маскирования может включать измерение аффинности связывания АСС с поверхностью клетки, которая экспонирует пептидную маску-кандидат, например, с помощью FACS. Другой неограничивающий иллюстративный анализ включает оценку способности пептидной маски ингибировать связывание АСС с его партнером по связыванию в терапевтически значимых концентрациях и времени. Для этого второго способа был разработан иммуносорбентный анализ для измерения зависящего от времени связывания пропротеина с его партнером по связыванию, как описано в US 20200308243, включенном в данный документ посредством ссылки. В варианте осуществления, в котором СР представляет собой цитокин IL-15, анализ эффективности маскирования может включать измерение уровня продукции секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP) в чувствительных к IL-2/IL15 клетках НЕК293, как изложено в Примере 6.

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 С-концу компонентов СР и СМ. Схема иллюстративного АСС представлена на **Фиг. 1А**. Что касается **Фиг. 1А**, АСС содержит от N-конца к С-концу компоненты СР и СМ: (1) первую мономерную конструкцию, имеющую СР1 **100**; СМ1 **120**, расположенный на С-конце относительно СР1 **100**; необязательный линкер **110**, который, если он присутствует, расположен между С-концом СР1 **100** и N-концом СМ1 **120**; DD1 **140**; и необязательный линкер **130**, который, если он присутствует, расположен между С-концом СМ1 **120**; и DD1 **140**; (2) вторую мономерную конструкцию, имеющую СР2 **150**; СМ2 **170**, расположенный на С-конце относительно СР2 **150**; необязательный линкер **160**, который, если он присутствует, расположен между С-концом СР2 **150** и N-концом СМ2 **170**; DD2 **190**; и необязательный линкер **180**, который, если он присутствует, расположен между С-концом СМ2 **170** и DD2 **190**; и (3) одну или более

ковалентных или нековалентных связей ( $\leftrightarrow$ ).

Схема еще одного иллюстративного АСС с его компонентами, расположенными в обратной ориентации АСС, представлена на **Фиг. 1В**. Что касается **Фиг. 1В**, АСС содержит от N-конца к С-концу компоненты СР и СМ: (1) первую мономерную конструкцию, имеющую DD1 **200**; СМ1 **220**; необязательный линкер **210**, который, если он присутствует, расположен между DD1 **200** и N-концом СМ1 **220**; СР1 **240**, расположенный на С-конце относительно СМ1 **220**; и необязательный линкер **230**, который, если он присутствует, расположен между С-концом СМ1 **220** и N-концом СР1 **240**; (2) вторую мономерную конструкцию, имеющую DD2 **250**; СМ2 **270**; необязательный линкер **260**, который, если он присутствует, расположен между DD2 **250** и N-концом СМ2 **270**; СР2 **290**, расположенный на С-конце относительно СМ2 **270**; и необязательный линкер **280**, который, если он присутствует, расположен между С-концом СМ2 **290** и N-концом СР2 **290**; и (3) одну или более ковалентных или нековалентных связей ( $\leftrightarrow$ ).

На **Фиг. 2А** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерную конструкции, которые связываются друг с другом нековалентно через первый и второй домены димеризации DD1 **340** и DD2 **390**, соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу компоненты СР и СМ, первый зрелый белок-цитокин СР1 **300**, первый необязательный линкер **310**, первый расщепляемый фрагмент СМ1 **320**, второй необязательный линкер **330** и первый домен димеризации DD1 **340**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй зрелый белок-цитокин СР2 **350**, третий необязательный линкер **360**, второй расщепляемый фрагмент СМ2 **370**, четвертый необязательный линкер **380** и второй домен димеризации DD2 **390**.

На **Фиг. 2В** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерную конструкции, которые связываются друг с другом нековалентно через первый и второй домены димеризации DD1 **400** и DD2 **450**, соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу компоненты СР и СМ, первый домен димеризации DD1 **400**, второй необязательный линкер **410**, первый расщепляемый фрагмент СМ1 **420**, первый необязательный линкер **430** и первый зрелый белок-цитокин СР1 **440**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу компоненты СР и СМ, второй домен димеризации DD2 **450**, четвертый необязательный линкер **460**, второй расщепляемый фрагмент СМ2 **470**, третий необязательный линкер **480** и второй зрелый белок-цитокин СР2 **490**. В альтернативных аспектах один из двух фрагментов, обозначенных как СР1 **440** и СР2 **490**, 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 440 и CP2 490, представляет собой мутированный белок-цитокин, не обладающий цитокиновой активностью. Например, CP1 или CP2 могут представлять собой укороченный интерферон альфа 2b, имеющий мутацию L130P. В альтернативных аспектах один из двух фрагментов, обозначенных как CP1 440 и CP2 490, представляет собой полипептидную последовательность, не обладающую цитокиновой активностью, например, сигнальный фрагмент и/или последовательность-«заглушку». В альтернативных аспектах первая из двух фрагментов, обозначенных как CP1 440 и CP2 490, представляет собой полипептидную последовательность, которая с высокой аффинностью связывается со вторым из двух фрагментов, обозначенных как CP1 440 и CP2 490, и снижает цитокиновую активность второй фрагмента по сравнению с контрольным уровнем второго фрагмента.

Было обнаружено, что структура АСС, включающая домен димеризации, очень эффективна в снижении активности компонентов в виде зрелого белка-цитокина таким образом, что не приводит к существенному нарушению цитокиновой активности после активации. Условием активации описанных в данном документе АСС является воздействие протеазы, которая может расщеплять по меньшей мере один из расщепляемых фрагментов (СМ) в АСС. Как показано в примерах, активация АСС привела к существенному восстановлению цитокиновой активности. Полученные результаты свидетельствуют о том, что конформация цитокиновых компонентов не была необратимо изменена в контексте АСС. Примечательно, что для достижения маскирующего эффекта в АСС не обязательно использовать пептидную маску, обладающую аффинностью связывания с компонентом в виде белка-цитокина. Таким образом, АСС может содержать или не содержать пептидную маску, обладающую аффинностью связывания с компонентом в виде белка-цитокина.

АСС может использовать любой из множества зрелых белков-цитокинов, расщепляемых фрагментов и DD в качестве CP1, CP2, CM1, CM2, DD1 и DD2, соответственно. Например, любой из множества зрелых белков-цитокинов, известных в данной области техники, или их последовательности и/или укороченные варианты могут подходить для применения в качестве одного или обоих компонентов CP1 и CP2 АСС. Зрелые белки-цитокины, CP1 и CP2, могут быть одинаковыми или разными. В определенных конкретных вариантах осуществления CP1 и CP2 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 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, эритропоэтин (EPO), TPO, Flt-3L, SCF, M-CSF, и MSP, и т. п., а также их последовательности и укороченные варианты. Например, последовательности таких белков включают последовательности, представленные в данном документе, а дополнительные последовательности можно получить на сайте [ncbi.nlm.nih.gov/protein](http://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, известные 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 предшествующих 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, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 347, и SEQ ID NO: 348. 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 включает мутант интерферона альфа 2b, например, молекулу интерферона альфа 2b, имеющую мутацию в положении L130, например, мутацию L130P, как CP1, так и CP2. 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 T, N или R; L128 до N, H или R; I24 на P 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 CP1 и CP2

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, любой из аминокислот в последовательности интерферона альфа 2b дикого типа от N-конца к C-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 любой промежуточной последовательности аминокислот или их мутантов.

В некоторых конкретных вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат интерлейкин. Интерлейкины, которые подходят для применения в конструкциях по настоящему изобретению в качестве CP1 и/или CP2, включают, например, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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. В некоторых вариантах осуществления интерлейкин включает интерлейкин дикого типа (ДТ) или рекомбинантный интерлейкин. В некоторых вариантах осуществления ДТ или рекомбинантный полипептид интерлейкина включает IL-15. Иллюстративные последовательности IL-15 представлены в SEQ ID NO: 347, SEQ ID NO: 348, SEQ ID NO: 129, и SEQ ID NO: 130.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 проявляют(-ет) интерлейкиновую активность 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 последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 111-134, 137-140, 143-146, 151-160, и 347-348. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат интерлейкин, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 111-134, 137-140, 143-146, 151-160, и 347-348. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат интерлейкин, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 347, и SEQ ID NO: 348. В определенных вариантах осуществления каждый из CP1 и/или CP2 независимо представляет собой интерлейкин, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 347. 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

интерлейкина 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 интерлейкина, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 347, и SEQ ID NO: 348. В определенных вариантах осуществления эталонная последовательность интерлейкина представляет собой эталонную последовательность человеческого интерлейкина, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 347, и SEQ ID NO: 348. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат зрелый интерлейкин, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 347, и SEQ ID NO: 348. 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 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 интерлейкина, соответствующей аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 347. В определенных конкретных вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат полипептид интерлейкина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 347. 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) интерлейкиновую активность и включают(-ет) 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% 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: 120, 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, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 347, и SEQ ID NO: 348. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержат 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, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 347, и SEQ ID NO: 348. 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-15 и включают(-ет) 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 IL-15, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 (IL-15 человека), SEQ ID NO: 347 (аминокислоты 49–161 IL-15 человека), и SEQ ID NO: 348 (аминокислоты 49–162 IL-15 человека). В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 содержат одну и ту же аминокислотную последовательность, и такая последовательность 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 последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 (IL-15 человека), SEQ ID NO: 347 (аминокислоты 49–161 IL-15 человека), и SEQ ID NO: 348 (аминокислоты 49–162 IL-15 человека).

Количество аминокислот в последовательности используемых белков-цитокинов может варьироваться в зависимости от конкретного используемого белка-цитокина. В некоторых вариантах осуществления каждый из CP1 и/или CP2 включает в общей сложности от около 10 до около 700 аминокислот, от около 10 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 350 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 300 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 150 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 100 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 80 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 60 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 40 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 400 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 350 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 300 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 150 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 100 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 80 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 60 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 40 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 400 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 350 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 300 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 150 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 100





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 700 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 sushi из альфа-цепи рецептора IL-15 человека (IL15R $\alpha$ ) и растворимого IL-15; барназы и барнстара; PKA и AKAP; модулей адаптера / стыковочной метки на основе мутированных фрагментов РНКазы I; пары антигенсвязывающих доменов (например, пары однодоменных антител); растворимых, чувствительных к N-этилmaleимиду рецепторов стыковочных белков (SNARE); модулей, основанных на взаимодействии белков синтаксина, синаптотагмина, синаптобревина, и SNAP25; однодоменного антитела (sdAb) и соответствующего эпитопа; антигенсвязывающего домена (например, одноцепочечного антитела, такого как одноцепочечный варибельный 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 «домен Fc» относится к непрерывной аминокислотной последовательности одной тяжелой цепи иммуноглобулина. 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 с выступом и впадиной включают мутанты Fc SEQ ID NO: 315 и 316, а также описанные в пат. США №№ 5731168; 7695936; и 10683368,

каждый из которых полностью включен в данный документ в полном объеме 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: 315 и 316, 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 FLAG, эпитопы AU1 и AU5, эпитоп Glu-Glu, эпитоп KT3, эпитоп IRS, эпитоп Btag, эпитоп протеинкиназы-C и эпитоп VSV.

В некоторых вариантах осуществления каждый из DD1 и/или DD2 включает в общей сложности от около 5 до около 250 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 180 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 160 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 140 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 120 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 100 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 80 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 60 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 40 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 10 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 180 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 160 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 140 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 120 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 100 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 80 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 60 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 40 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 180



аминокислот, от около 217 до около 200 аминокислот, или от около 218 до около 200 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 в шарнирной области при чтении в направлении от N-конца к C-концу (например, цистеин 226 человеческого IgG1 или IgG4, согласно нумерации EU).

В некоторых аспектах между компонентами CP и DD прямо или опосредованно (например, через линкер) расположен расщепляемый фрагмент, который содержит субстрат для протеазы. В некоторых вариантах осуществления каждый из CM1 и CM2 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 B, 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.

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, ADEMDEC1, 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.

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 CM1 и/или CM2, используемых в данном документе, включают те, которые чаще всего обнаруживаются в раковых клетках и тканях. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления каждый из CM1 и/или CM2 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 злокачественное новообразование 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 CM1 и/или CM2 независимо включает(-ют) последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 до SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 349, а также их С-концевые и N-концевые укороченные варианты.

В некоторых вариантах осуществления СМ включает последовательность, выбранную из группы: ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 41), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68), SGRSDNI (SEQ ID NO: 100), и LSGRSNI (SEQ ID NO: 349).

В некоторых вариантах осуществления СМ1 и/или СМ2 включают(-ет) последовательность, выбранную из группы: APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 263), 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 их С-концевые и N-концевые укороченные варианты. Примеры СМ также включают те, которые описаны в публикациях заявок на патенты США № 2016/0289324, 2019/0284283 и в публикациях под номерами WO 2010/081173, WO 2015/048329, WO 2015/116933, WO 2016/118629 и WO 2020/118109, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Укороченными вариантами вышеупомянутых аминокислотных последовательностей, которые подходят для применения в СМ1 и/или СМ2, являются любые варианты, 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, СМ1 и/или СМ2 содержат в общей сложности от около 3 до около 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления СМ1 и/или СМ2 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 СМ1 и СМ2 содержат субстраты для разных протеаз. В некоторых вариантах осуществления СМ1 и СМ2 содержат 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 СР1 и СМ1. В некоторых вариантах осуществления СР1 и СМ1 непосредственно примыкают друг к другу в первом мономере. В некоторых вариантах осуществления первый мономер содержит линкер, расположенный между СМ1 и DD1. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет общую длину от 1 аминокислоты до около 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления СМ1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу в первом мономере. В некоторых вариантах осуществления СМ и любые линкеры, расположенные между СР1 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 СР2 и СМ2. В некоторых вариантах осуществления СР2 и СМ2 непосредственно примыкают друг к другу во втором мономере. В некоторых вариантах осуществления второй мономер содержит линкер, расположенный между СМ2 и DD2. В

некоторых вариантах осуществления линкер имеет общую длину от 1 аминокислоты до около 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит последовательность G; GG; или GGGS (SEQ ID NO: 2). 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 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 каждый из первого мономера и/или второго мономера может включать 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 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 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 650 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 предложена в виде конструкции с ограничением конформационной подвижности, можно вставить гибкий линкер для облегчения образования и поддержания структуры в нерасщепленной 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. В некоторых вариантах осуществления уменьшение длины линкеров или связывающей области снижает активность зрелого белка-цитокина в АСС (см., например, **Фиг. 7А-7В** и **8А-8В**). В большинстве случаев длина линкера определяется путем подсчета в направлении от N-конца к С-концу количества аминокислот от N-конца линкера, примыкающего к С-концу аминокислоты предыдущего компонента, до С-конца линкера, примыкающего к N-концу аминокислоты следующего компонента (т. е. когда длина линкера не включает ни С-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 С-концевой аминокислоте предшествующего компонента к С-концу линкера, примыкающего к первому цистеину шарнирной области Fc (т. е. там, где длина линкера не включает С-концевую аминокислоту предшествующего компонента или первый цистеин шарнирной области Fc).

Как видно из настоящего описания и **Фиг. 14**, АСС по настоящему изобретению включают участок аминокислот между СР и проксимальной точкой взаимодействия между доменами димеризации. Этот участок аминокислот может называться связывающей областью (LR). 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, который задействован в дисульфидной связи Fc (например, цистеин 226 домена Fc IgG1 или IgG4 в соответствии с нумерацией EU). Когда домен димеризации не является пептидом, 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 некоторых аспектах связывающая область может содержать не более 24, 18, 14, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислоты, например, 5–14, 7–12, 7–11 или 8–11 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления дополнительные аминокислотные последовательности могут быть расположены на N-конце или С-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 до около 15 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 14 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 12 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 10 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 8 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 6 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 5 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 4 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 3 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 2 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 24 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 22 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 18 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 16 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 15 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 14 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 12 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 10 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 8 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 6 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 5 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 4 аминокислот, от около 2 аминокислот до около 3 аминокислот, от около 4 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 4 аминокислот до около 24 аминокислот, от около 4 аминокислот до около 22 аминокислот, от около 4 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 4 аминокислот до около 18 аминокислот,



до около 24 аминокислот, от около 14 аминокислот до около 22 аминокислот, от около 14 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 14 аминокислот до около 18 аминокислот, от около 14 аминокислот до около 16 аминокислот, от около 14 аминокислот до около 15 аминокислот, от около 15 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 15 аминокислот до около 24 аминокислот, от около 15 аминокислот до около 22 аминокислот, от около 15 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 15 аминокислот до около 18 аминокислот, от около 15 аминокислот до около 16 аминокислот, от около 16 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 16 аминокислот до около 24 аминокислот, от около 16 аминокислот до около 22 аминокислот, от около 16 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 16 аминокислот до около 18 аминокислот, от около 18 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 18 аминокислот до около 24 аминокислот, от около 18 аминокислот до около 22 аминокислот, от около 18 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 24 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 22 аминокислот, от около 22 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 22 аминокислот до около 24 аминокислот, или от около 24 аминокислот до около 25 аминокислот).

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном 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 авторы изобретения обнаружили, что АСС, которые не содержат какие-либо линкеры между СР и DD, демонстрируют наиболее значительное снижение цитокиновой активности по сравнению со зрелым цитокином дикого типа. См. **Фиг. 7А** и **8А**. Кроме того, конфигурация, в которой нет линкеров между СР и DD, по-прежнему обеспечивает эффективное расщепление CM, расположенного между СР и DD. См. **Фиг. 9-11**. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления АСС не содержит линкеров между СР и DD, а CM 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 ACC, 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) (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более последовательностей GGGS). В некоторых вариантах осуществления линкер имеет одну или более последовательностей Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (GGGGS) (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более последовательностей GGGGS). В некоторых вариантах осуществления линкер имеет одну или более последовательностей Gly-Gly-Ser-Gly (GGSG) (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 любое из одного или более из: G, GG, GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 210), GGGS (SEQ ID NO: 2), GGGSGGGS (SEQ ID NO: 211), GGGSGGGS (SEQ ID NO: 212), GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 215), GGGGS (SEQ ID NO: 216), GS, GGGSGS (SEQ ID NO: 217), GGGSGGGSGGGSGS (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), GSTSGSGKSSEGSGSTKG (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 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), GSSGSGGSGG (SEQ ID NO: 210), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213), GGGGSGS (SEQ ID NO: 217), GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 218), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 235), GGSLDAPKGGGGS (SEQ ID NO: 219), и GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226).

В некоторых вариантах осуществления линкер включает последовательность, выбранную из группы: GGSLDAPKGGGGS (SEQ ID NO: 219), GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 218), GGGGSGS (SEQ ID NO: 217), GS, (GS)<sub>n</sub>, (GGS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 227) и (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 228), GGS (SEQ ID NO: 229), GGS (SEQ ID NO: 230), GSGSG (SEQ ID NO: 231), GSGGG (SEQ ID NO: 232), GGGSG (SEQ ID NO: 233), GSSSG (SEQ ID NO: 234), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 235), GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226), (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 216), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере одному. В некоторых вариантах осуществления линкер включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из: GGSLDAPKGGGGS (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: 235), 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). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит один остаток глицина (G) или последовательность из двух остатков глицина (GG).

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 АСС. В определенных вариантах осуществления контрольным уровнем может быть уровень активности пегилированного CP1 и/или CP2.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность представляет собой аффинность связывания ( $K_D$ ) CP1 и/или CP2 с его когнатным рецептором, определяемую с помощью поверхностного плазмонного резонанса (например, проводимого в фосфатно-солевом буфере при 25°C). 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 некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность представляет собой уровень продукции SEAP в клеточном анализе на основе клеток НЕК. 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 или 1000-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, 200–500-кратным снижением, 300–500-кратным снижением, 400–500-кратным снижением, 500–600-кратным снижением, 600–700-кратным снижением, 150–1000-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, 100–500-кратным снижением, 20–50-кратным снижением, 30–50-кратным снижением, 40–50-кратным снижением, 100–400-кратным снижением, 200–400-кратным снижением, или 300–400-кратным снижением, 100–300-кратным снижением, 200–300-кратным снижением, или 100–200-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 CM1 и CM2 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 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 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 цитокинового продукта(-ов) по меньшей мере в 1-20 раз выше, 2–20 раз больше, 3–20 раз больше, 4–20 раз больше, 5–20 раз больше, 10–20 раз больше, 15–20 раз больше, 1–15 раз больше, 2–15 раз больше, 3–15 раз больше, 4–15 раз больше, 5–15 раз больше, 10–15 раз больше, 1–10 раз больше, 2–10 раз больше, 3–10 раз больше, 4–10 раз больше, 5–10 раз больше, 1–5 раз больше, 2–5 раз больше, 3–5 раз больше, 4–5 раз больше, 1–4 раз больше, 2–4 раз больше, 3–4 раз больше, 1–3 раз больше, 2–3 раз больше или 1–2 раз больше чем одна или более активностей 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: 347 или 348. 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 SEQ ID NO: 357. В некоторых аспектах АСС может включать такие последовательности, но либо с сигнальными последовательностями этих последовательностей, либо без них. Сигнальные последовательности конкретно не ограничены. Некоторые неограничивающие примеры сигнальных последовательностей включают, например, остатки 1–20 SEQ ID NO: 309 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: 343) и MALTFALLVALLVLSCSSCSVG (SEQ ID NO: 344).

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

цитоклиновых конструкций и способов получения активируемых цитоклиновых конструкций описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления СМ выбран для применения со специфической 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  $\alpha$ -типа ( $\alpha$ PA, 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 является субстратом для MMP7. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для MMP9. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом 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 субстратов 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 является субстратом для MMP и включает последовательность ISSGLLSS (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); RPSMWAY (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 ISSGLLSS (SEQ ID NO: 73).

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

В некоторых вариантах осуществления СМ включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы NTLGRSENHSG (SEQ ID NO: 9); NTLGRSGNHGS (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 легумаина. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для матриптазы. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом 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); QNQUALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 271); LSGRSGNHGGSGGSQLRMA (SEQ ID NO: 272); QNQUALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 273), и/или ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 274).

В некоторых вариантах осуществления СМ1 и/или СМ2 содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 5 по 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), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 41), и LSGRSNI (SEQ ID NO: 349).

Некоторые аспекты относятся к ACC, которая включает CP1, выбранный из SEQ ID NO: 111-134, 137-140, 143-146, 151-160, и 347-348, CM1, выбранный из SEQ ID NO: 5-100 и 263-308, и DD1, димеризованный с CP2, выбранным из SEQ ID NO: 111-134, 137-140, 143-146, 151-160, и 347-348, CM2, выбранный из SEQ ID NO: 5-100 и 263-308, и DD2. В некоторых аспектах ACC может включать между CP1 и CM1 и/или между CM1 и DD1, линкер, выбранный из SEQ ID NO: 2 и 210-234, 245 или 250, и между CP2 и CM2 и/или между CM2 и DD2, линкер, выбранный из SEQ ID NO: 2 и 210-234, 245, или 250. В некоторых вариантах осуществления ACC включает DD1 и/или 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: 3 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления ACC 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: 315 или SEQ ID NO: 316. В некоторых вариантах осуществления ACC 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: 315 или SEQ ID NO: 316.

### **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: доластатинины и их производные (например, ауристин Е, АFР, монометилауристин D (MMAД), 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 (CemCH<sub>2</sub>-SH), вариант токсина A *Pseudomonas* (PES8), вариант токсина A *Pseudomonas* (ZZ-PE38), ZJ-101, антрациклин, доксорубицин, даунорубицин, бриостатин, камптотецин, 7-замещенный камптотецин, 10, 11-дифторметилендиоксиамптотецин, комбретастатины, дебромоеплизиатоксин, 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 *Phytoiaca Americana* (например, PAPI, PAPII и PAP-8), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Sapaonaria 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, вельбан, онковин, фторурацил, метотрексат, тиотепа,

бисантрен, 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-O-(2-O-4-метоксибензоил-бета-D-ксилопиранозил)-(1->3)-(2-O-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 иллюстративные радиофармацевтические препараты, которые можно конъюгировать с любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, включают:  $^{123}\text{I}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{38}\text{K}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{11}\text{C}$ , 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  $\beta$ -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 pH восстановительного реакционного раствора. Любая подходящая комбинация факторов (например, отношение восстанавливающего агента к АСС, продолжительность и температура инкубации с восстанавливающим агентом и/или pH 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 около 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 около 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 около 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 восстановлена 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. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. Некоторые неограничивающие примеры расщепляемых фрагментов и линкеров представлены в таблице 1.

**Таблица 1.**

Типы СМ	Аминокислотная последовательность
<u>СМ для плазмина</u>	
Проурокиназа	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 280) PRFRIIGG (SEQ ID NO: 281)
TGF $\beta$	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 $\alpha$ 1 (I))	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 290)
Коллаген кожи телят (цепь $\alpha$ 2 (I))	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 291)
Коллаген бычьего хряща (цепь $\alpha$ 1 (II))	GIAGQ (SEQ ID NO: 292)
Коллаген печени человека (цепь $\alpha$ 1 (III))	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 293)
$\alpha$ 2M человека	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 294)
PZP человека	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 295) AGLGVVER (SEQ ID NO: 296) AGLGISST (SEQ ID NO: 297)
$\alpha$ 1M крысы	EPQALAMS (SEQ ID NO: 298)

$\alpha_2$ M крысы	QALAMSAI (SEQ ID NO: 299)
	AAVHLSVQ (SEQ ID NO: 300)
	MDAFLESS (SEQ ID NO: 301)
$\alpha_1$ I <sub>3</sub> (2J) крысы	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 302)
$\alpha_1$ I <sub>3</sub> (27J) крысы	SAPAVESE (SEQ ID NO: 303)
Коллагеназа фибробластов человека	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 304)
<u>(аутолитические расщепления)</u>	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 разнообразие возможных фрагментов может быть связано с АСС по данному 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 которой 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-пиридилдитиол)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 рицин 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 СМ и линкеры содержат компоненты, имеющие разные свойства, что приводит к образованию конъюгатов 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 эфиры, 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 не природных 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 СР1

и СМ1. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая белковую часть второго мономера, кодирует полипептид, содержащий фрагменты СР2 и СМ2. 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 подходящих для трансформации клеток (например, клеток млекопитающих), хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al., Eds. «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 2<sup>nd</sup> 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 любой из описанных в данном документе АСС, 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, способствующих пролиферации, дифференцировке и росту клеток. 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 невосстанавливающих 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 прогрессирующего злокачественного новообразования, ингибированию метастазирования злокачественного новообразования или снижению риска рецидива злокачественного новообразования у субъекта, страдающего злокачественным новообразованием.

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, 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 BRCA2) 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, экстрагонадную; 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; гипофарингеальный 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; грибovidный микоз; миелодиспластические синдромы; миелогенный лейкоз, хронический; острый миелоидный лейкоз детского возраста; множественную миелому; хронические миелопролиферативные 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 парашитовидной 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**

<b>Торговое название антитела (название антитела)</b>	<b>Мишень</b>
Raptiva™ (эфализумаб)	CD11a
Arzerra™ (офатумумаб)	CD20
Веххар™ (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™ (эртумаксумаб)	CD3/Her2
Erbix™ (цетуксимаб)	EGFR
Portrazza™ (нецитумумаб)	EGFR
Vectibix™ (панитумумаб)	EGFR

СН806	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
(адекатумумаб)	ЕpСAM
Ранорех™ (эдреколомаб)	ЕpСAM
Vicinium™	ЕpСAM
Synagis™ (паливизумаб)	F-белок РСВ
ReoPro™ (абциксимаб)	Гликопротеиновые IIb/IIIa рецепторы
Нерсептин™ (трастузумаб)	Her2
Нерсептин™ Нуlecta (трастузумаб; гиалуронидаза)	Her2
(трастузумаб дерукстекан)	Her2
(гертузумаб вердотин)	Her2
Кадсула™ (трастузумаб эмтанзин)	Her2
(маргетуксимаб)	Her2
(тимигутузумаб)	Her2
Xolair™ (омализумаб)	IgE
(лигелизумаб)	IgE
(фигитумумаб)	IGF 1R
(тепротумумаб)	IGF 1R
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
BVD100 (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
Сimzia™ (Цертолизумаб пегол)	TNF $\alpha$
Remicade™ (инфликсимаб)	TNF $\alpha$
Humira™ (адалимумаб)	TNF $\alpha$
Simponi™ (голимумаб)	TNF $\alpha$
Enbrel™ (этанерцепт)	TNF-R
(мапатумумаб)	TRAIL-R1
Avastin™ (бевацизумаб)	VEGF
Lucentis™ (ранибизумаб)	VEGF
(бролуцизумаб)	VEGF
(вануцизумаб)	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 полиортоэфиры 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. Второй терапевтический агент(-ы) может быть предложен в дозированной форме, которая отделена от АСС. Альтернативно, второй терапевтический агент(-ы) может быть составлен вместе с АСС. В некоторых вариантах осуществления набор содержит (1) АСС, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 347-356, и (2) второй терапевтический агент, выбранный из таблицы 2.

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 следующие неограничивающие аспекты:

1. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС – англ.: activatable cytokine construct), которая включает первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, в которой:
  - (a) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1), где CM1 расположен между CP1 и DD1; 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; или
- (a) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый домен димеризации (DD1) и
- (b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый белок-цитокин (CP2), расщепляемый фрагмент (CM) и второй домен димеризации (DD2), где CM расположен между CP2 и DD2, причем CM функционирует в качестве субстрата для протеазы; или
- (a) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый белок-цитокин (CP1), расщепляемый фрагмент (CM) и первый домен димеризации (DD1), где CM расположен между CP1 и DD1, и

(b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый белок-цитокин (CP2) и второй домен димеризации (DD2), где CM функционирует в качестве субстрата для протеазы; или

(a) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый белок-цитокин (CP1) и первый домен димеризации (DD1), и

(b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый белок-цитокин (CP2) и второй домен димеризации (DD2), где CP1, CP2 или оба CP1 и CP2 включают аминокислотную последовательность, которая функционирует в качестве субстрата для протеазы;

дополнительно при этом:

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

(d) ACC 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.

2. ACC по аспекту 1, в которой первая мономерная конструкция содержит первый полипептид, который содержит CP1, CM1 и DD1.
3. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–2, в которой вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, который содержит CP2, CM2 и DD2.
4. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–3, в которой DD1 и DD2 представляют собой пару, выбранную из группы, состоящей из: пары доменов Fc; домена sushi из альфа-цепи рецептора IL-15 человека (IL15R $\alpha$ ) и растворимого IL-15; барназы и барнстара; PKA и AKAP; модулей адаптера / стыковочной метки на основе мутированных фрагментов PHказы I; эпитопа и sdAb; эпитопа и scFv; модулей SNARE, основанных на взаимодействии белков синтаксина, синаптоагмина, синаптобревина и SNAP25; антигенсвязывающего домена и эпитопа.
5. ACC по аспекту 4, в которой DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc.
6. ACC по аспекту 5, в которой пара доменов Fc представляет собой пару доменов Fc человека.
7. ACC по аспекту 6, в которой домены Fc человека представляют собой домены Fc IgG1 человека, домены Fc IgG2 человека, домены Fc IgG3 человека или домены Fc IgG4 человека.

8. ACC по аспекту 7, в которой домены Fc человека представляют собой домены Fc IgG4 человека.
9. ACC по аспекту 8, в которой домены Fc человека содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 315 или SEQ ID NO: 316.
10. ACC по аспекту 9, в которой домены Fc человека содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 315 или SEQ ID NO: 316.
11. ACC по аспекту 10, в которой домены Fc человека содержат SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 315 или SEQ ID NO: 316.
12. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–3 и 5–11, в которой DD1 и DD2 являются одинаковыми.
13. ACC по аспекту 4, в которой DD1 содержит антигенсвязывающий домен, а DD2 содержит соответствующий эпитоп.
14. ACC по аспекту 13, в которой антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен к His-метке, и при этом DD2 содержит His-метку.
15. ACC по аспекту 13, в которой антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).
16. ACC по аспекту 13, в которой антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb).
17. ACC по аспекту 1, в которой по меньшей мере один из DD1 и DD2 содержит заместитель домена димеризации, выбранный из группы, состоящей из неполипептидного полимера и малой молекулы.
18. ACC по аспекту 17, в которой DD1 и DD2 содержат неполипептидные полимеры, ковалентно связанные друг с другом.
19. ACC по аспекту 18, в которой неполипептидный полимер представляет собой серосодержащий полиэтиленгликоль, и при DD1 и DD2 ковалентно связаны друг с другом посредством одной или более дисульфидных связей.
20. ACC по аспекту 17, в которой по меньшей мере один из DD1 и DD2 содержит малую молекулу.
21. ACC по аспекту 20, в которой малая молекула представляет собой биотин.
22. ACC по аспекту 20, в которой DD1 содержит биотин, а DD2 содержит авидин.
23. ACC по любому одному аспекту или комбинации аспектов 1–22, в которой каждый из CP1 и/или CP2 по отдельности представляет собой интерлейкин.

24. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 1–23, в которой CP1 и CP2 являются одинаковыми.
25. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 1–23, в которой CP1 и CP2 являются разными.
26. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 1–23, в которой каждый из CP1 и/или CP2 по отдельности выбран из группы, состоящей из: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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-15, IL-16, и IL-17.
27. АСС по аспекту 26, в которой CP1 и CP2 выбраны из группы, состоящей из IL-2, IL-10, IL-12, IL-15 и IL-21.
28. АСС по аспекту 26, в которой CP1 и CP2 представляют собой разные интерлейкины.
29. АСС по аспекту 26, в которой CP1 и CP2 представляют собой один и тот же интерлейкин.
30. АСС по аспекту 26, в которой CP1 или CP2 представляет собой интерлейкин.
31. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 26–30, в которой интерлейкин(-ы) представляет собой зрелый интерлейкин дикого типа человека.
32. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 26–31, в которой интерлейкин представляет собой IL-2, IL-10, IL-12 или IL-15.
33. АСС по аспекту 32, в которой интерлейкины представляют собой IL-2, IL-12 и IL-15.
34. АСС по аспекту 33, в которой интерлейкин представляет собой по меньшей мере один из IL-2 и IL-15.
35. АСС по аспекту 34, в которой интерлейкин представляет собой IL-15.
36. АСС по аспекту 35, в которой CP1 и/или CP2 содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129, 347 и 348.
37. АСС по аспекту 36, в которой CP1 и/или CP2 содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129, 347 и 348.
38. АСС по аспекту 37, в которой CP1 и/или CP2 содержат последовательность SEQ ID NO: 347.
39. АСС по аспекту 32, в которой интерлейкин представляет собой IL-15.
40. АСС по аспекту 38, в которой интерлейкин имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 347 и SEQ ID NO: 348.

41. ACC по любому одному из аспектов 1–40, в которой CP1 и/или CP2 содержат домен интерлейкина.
42. ACC по аспекту 41, в которой каждый из CP1 и CP2 содержит интерлейкин.
43. ACC по аспекту 42, в которой интерлейкин выбран из группы, состоящей из IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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.
44. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–43, в которой CM1 и/или CM2 содержат в общей сложности от около 3 до около 15 аминокислот.
45. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–44, в которой CM1 и CM2 содержат субстраты для различных протеаз.
46. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–44, в которой CM1 и CM2 содержат субстраты для одной и той же протеазы.
47. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–46, в которой 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.
48. ACC по аспекту 47, в которой 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.
49. ACC по аспекту 47, в которой 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), NTLGRSENHSG (SEQ ID NO: 9), NTLGRSGNHGS (SEQ ID NO: 10),

TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 11), TSGRSANP (SEQ ID NO: 12), VHMP LGFLGP (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), SMLRSMP L (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), GLSGRSDNHGGVHMP LGFLGP (SEQ ID NO: 71), LSGRSDNHGGVHMP LGFLGP (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), GPRSF G (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), SGRSDNI (SEQ ID NO: 100), и LSGRSNI (SEQ ID NO: 349).
50. ACC по аспекту 47, в которой CM1 и/или CM2 содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из: ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), LSGRSNI (SEQ ID NO: 41), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), SGRSDNI (SEQ ID NO: 100), ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68), и LSGRSNI (SEQ ID NO: 349).
  51. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–50, в которой протеаза(-ы) продуцируется(-ются) опухолью у субъекта.
  52. ACC по аспекту 51, в которой у субъекта диагностировано или идентифицировано злокачественное новообразование.
  53. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–52, в которой CP1 и CM1 непосредственно примыкают друг к другу в первой мономерной конструкции.
  54. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–53, в которой CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу в первой мономерной конструкции.
  55. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–54, в которой CP2 и CM2 непосредственно примыкают друг к другу во второй мономерной конструкции.
  56. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–55, в которой CM2 и DD2 непосредственно примыкают друг к другу во второй мономерной конструкции.
  57. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–56, в которой первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер.
  58. ACC по аспекту 57, в которой по меньшей мере один линкер представляет собой линкер L1, расположенный между CP1 и CM1, и/или линкер L2, расположенный между CM1 и DD1.
  59. ACC по аспекту 58, в которой вторая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер.
  60. ACC по аспекту 59, в которой по меньшей мере один линкер представляет собой линкер L3, расположенный между CP2 и CM2, и/или линкер L4, расположенный между CM2 и DD2.
  61. ACC по аспекту 60, в которой первая мономерная конструкция содержит линкер L1, а вторая мономерная конструкция содержит линкер L3.

62. ACC по аспекту 61, в которой L1 и L3 являются одинаковыми.
63. ACC по аспекту 62, в которой вторая мономерная конструкция содержит линкер L2, а вторая мономерная конструкция содержит линкер L4.
64. ACC по аспекту 63, в которой L2 и L4 являются одинаковыми.
65. ACC по аспекту 64, в которой каждый линкер имеет общую длину от 1 аминокислоты до около 15 аминокислот.
66. ACC по аспекту 65, в которой каждый линкер имеет общую длину по меньшей мере 5 аминокислот.
67. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–66, в которой первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер, причем каждый линкер независимо выбран из группы, состоящей из G; GG; 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); 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); SKYGPPCPPCPAPEFLG (SEQ ID NO: 221); GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 222); GSTSGSGKSSEGK (SEQ ID NO: 223); GSTSGSGKSSEGSGSTK (SEQ ID NO: 224); GSTSGSGKPGSGEGSTK (SEQ ID NO: 225); GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226); (GS)<sub>n</sub>, (GG)<sub>n</sub>, (GSGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 227), (GGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 228), (GGGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 216), где каждый n представляет собой целое число, равное по меньшей мере единице; 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: 235); и GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226).
68. ACC по аспекту 67, в которой линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из G, GG и GGGS (SEQ ID NO: 2).
69. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–68, в которой первая мономерная конструкция содержит в направлении от N-конца к C-концу CP1, CM1 и DD1, прямо или опосредованно связанный с C-концом CM1.
70. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 1–69, в которой первый полипептид содержит в направлении от C-к N-концу CP1, CM1 и DD1, прямо или опосредованно связанный с N-концом CM1.

71. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 1–70, в которой второй полипептид содержит в направлении от N-конца к C-концу CP2, CM2 и DD2, прямо или опосредованно связанный с C-концом CM2.
72. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 1–71, в которой второй полипептид содержит в направлении от C-конца к N-концу CP2, CM2 и DD2, прямо или опосредованно связанный с CM2.
73. АСС по аспекту 69, в которой первая мономерная конструкция содержит в направлении от N-конца к C-концу 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 такая 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.
74. АСС по аспекту 73, в которой CP1 представляет собой интерлейкин.
75. АСС по аспекту 74, в которой CP1 представляет собой IL-15.
76. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–75, в которой по меньшей мере одна активность CP1 и/или CP2 представляет собой аффинность связывания ( $K_D$ ) CP1 и/или CP2 с их когнатным рецептором, определяемую с помощью поверхностного плазмонного резонанса.
77. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–75, в которой по меньшей мере одна активность CP1 и/или CP2 представляет собой уровень пролиферации клеток лимфомы.
78. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–75, в которой по меньшей мере одна активность CP1 и/или CP2 представляет собой уровень активации пути JAK/STAT/ISGF3 в клетке лимфомы.
79. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–75, в которой по меньшей мере одна активность представляет собой уровень продукции SEAP в клетке НЕК.
80. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–79, в которой АСС характеризуется по меньшей мере 20-кратным снижением по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем.
81. АСС по аспекту 80, в которой АСС характеризуется по меньшей мере 50-кратным снижением активности по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем.

82. АСС по аспекту 81, в которой АСС характеризуется по меньшей мере 100-кратным снижением по меньшей мере одной активности СР1 и/или СР2 по сравнению с контрольным уровнем.
83. АСС по аспекту 82, в которой АСС характеризуется по меньшей мере 500-кратным снижением по меньшей мере одной активности СР1 и/или СР2 по сравнению с контрольным уровнем.
84. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 1–83, в которой 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).
85. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 1–83, в которой контрольный уровень по меньшей мере одного СР1 и/или СР2 представляет собой соответствующую активность СР1 и/или СР2 соответствующего зрелого цитокина дикого типа.
86. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 1–85, в которой АСС характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия протеазы (протеаз), при этом продукт расщепления имеет по меньшей мере одну активность СР1 и/или СР2.
87. АСС по аспекту 86, в которой по меньшей мере одна активность СР1 и/или СР2 представляет собой антипролиферативную активность.
88. АСС по аспекту 87, в которой 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.
89. Композиция, содержащая АСС по любому одному или комбинации из аспектов 1–88.
90. Композиция по аспекту 89, в которой композиция представляет собой фармацевтическую композицию.
91. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащие по меньшей мере одну дозу композиции по аспекту 89 или 90.
92. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества АСС по любому одному или комбинации из аспектов 1–88 или композиции по аспектам 89 или 90.
93. Способ по аспекту 92, в котором у субъекта идентифицировано или диагностировано

- злокачественное новообразование.
94. Способ по аспекту 93, в котором злокачественное новообразование представляет собой лимфому, солидную опухоль, гематологическую опухоль, саркому, остеосаркому, глиобластому, нейробластому, меланому, рабдомиосаркому, саркому Юинга, остеосаркому, В-клеточные новообразования, множественную миелому, В-клеточную лимфому, В-клеточную неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелолейкоз (СМL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), миелодиспластические синдромы (MDS), кожную Т-клеточную лимфому, ретинобластому, рак мочевого пузыря, рак желудка, уротелиальную карциному, рак легкого, рак толстой кишки, почечно-клеточный рак, рак желудка и пищевода, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак молочной железы, колоректальный рак, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак эндометрия, рак шейки матки, рак печени или гепатоцеллюлярную карциному.
  95. Способ по аспекту 94, в котором лимфома представляет собой лимфому Беркитта.
  96. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит СР1 и СМ1 АСС по любому одному или комбинации из аспектов 1–88.
  97. Нуклеиновая кислота по аспекту 96, в которой полипептид дополнительно содержит DD1 по любому одному или комбинации из аспектов 1–16 или аспектов 23–88.
  98. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит СР2 и СМ2 из АСС по любому одному или комбинации из аспектов 1–88.
  99. Нуклеиновая кислота по аспекту 98, в которой полипептид дополнительно содержит DD2 по любому одному или комбинации из аспектов 1–16 или аспектов 23–88.
  100. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому одному или комбинации из аспектов 96–99.
  101. Вектор по аспекту 100, в котором вектор представляет собой вектор экспрессии.
  102. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому одному или комбинации из аспектов 96–99 или вектор по аспекту 100 или 101.
  103. Пара нуклеиновых кислот, которые вместе кодируют полипептид, который содержит СР1 и СМ1 первой мономерной конструкции, и полипептид, который содержит СР2 и СМ2 второй мономерной конструкции, по любому одному или комбинации из аспектов 1–88.
  104. Пара векторов, которые вместе содержат пару нуклеиновых кислот по аспекту 103.

105. Пара векторов по аспекту 104, в которой пара векторов представляет собой пару векторов экспрессии.
106. Клетка, содержащая пару нуклеиновых кислот по аспекту 103 или пару векторов по аспектам 104 или 105.
107. Способ получения АСС, включающий:
  - культивирование клетки по аспекту 102 или 106 в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для получения АСС; и
  - выделение АСС из клетки или жидкой культуральной среды.
108. Способ по аспекту 107, дополнительно включающий:
  - выделение АСС, выделенной из клетки или жидкой культуральной среды.
109. Способ по аспекту 108, дополнительно включающий:
  - составление фармацевтической композиции на основе выделенной АСС.
110. АСС, полученная с помощью способа по аспекту 107.
111. Композиция, содержащая АСС по аспекту 110.
112. Композиция по аспекту 111, в которой композиция представляет собой фармацевтическую композицию.
113. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащие по меньшей мере одну дозу композиции по аспекту 111 или 112.
114. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС – англ.: activatable cytokine construct), содержащая первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, в которой:
  - (a) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1);
  - (b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый белок-цитокин (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2);
  - (c) первая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу CP1, CM1 и DD1, дополнительно при этом:
    - (i) каждый из первого мономера и второго мономера содержит связывающую область, содержащую не более 24 аминокислот; и
    - (ii) CP1 представляет собой зрелый интерлейкин;
  - (d) дополнительно при этом:
    - (i) вторая мономерная конструкция является такой же, как и первая мономерная конструкция,
    - (ii) первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с

другом через по меньшей мере одну дисульфидную связь, и

(iii) DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc человеческого IgG;

(e) DD1 и DD2 связываются друг с другом, образуя димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и

(f) ACC характеризуется сниженным уровнем активности интерлейкина по сравнению с соответствующим контрольным интерлейкином.

115. ACC по аспекту 114, в которой CP1 представляет собой зрелый интерлейкин человека.
116. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 114–115, в которой зрелый интерлейкин представляет собой зрелый IL-15.
117. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 114–116, в которой зрелый интерлейкин представляет собой укороченную форму IL-15.
118. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 114–116, в которой зрелый интерлейкин содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 347, и SEQ ID NO: 348.
119. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 114–116, в которой зрелый интерлейкин содержит последовательность SEQ ID NO: 347.
120. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 114–119, в которой CP1 и CM1 непосредственно примыкают друг к другу, CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу, и каждый из CM1 и CM2 содержит не более 10 аминокислот, необязательно не более 7 аминокислот.
121. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 114–120, в которой каждый из CM1 и CM2 независимо функционирует в качестве субстрата урокиназы (uPa) и/или матриксной металлопротеиназы (MMP).
122. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 114–121, в которой каждый из CM1 и CM2 независимо функционирует в качестве субстрата урокиназы (uPa) и/или MMP-14.
123. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 114–122, в которой каждый из CM1 и CM2 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 100.
124. ACC по любому одному или комбинации из аспектов 114–123, в которой каждый из CM1 и CM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 100, и LSGRSNI (SEQ ID NO: 349).

125. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–124, в которой DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc человеческого IgG1 или пару доменов Fc человеческого IgG4.
126. АСС по аспекту 125, в которой DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc человеческого IgG1, укороченных на N-конце до цистеина 226 согласно нумерации EU, или пару доменов Fc человеческого IgG4, укороченных на N-конце до цистеина 226 согласно нумерации EU.
127. АСС по аспекту 125 или 126, в которой DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc человеческого IgG4, которые содержат мутацию S228P согласно нумерации EU.
128. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–127, в которой каждый из DD1 и DD2 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 3.
129. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–128, в которой каждый из DD1 и DD2 содержит последовательность SEQ ID NO: 3.
130. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–129, в которой первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом через по меньшей мере две дисульфидные связи.
131. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–130, в которой первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом через по меньшей мере три дисульфидные связи.
132. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–131, в которой первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом через по меньшей мере четыре дисульфидные связи.
133. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–132, в которой первая мономерная конструкция дополнительно содержит сигнальную последовательность, непосредственно примыкающую к N-концу CM1.
134. АСС по аспекту 133, в которой сигнальная последовательность содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 345.
135. АСС по аспекту 133, в которой сигнальная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 345.
136. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–135, содержащая связывающую область, содержащую не более 18 аминокислот или не более 12

- аминокислот.
137. АСС по аспекту 136, в которой связывающая область содержит от 7 до 12 аминокислот.
  138. АСС по аспекту 136, в которой связывающая область содержит 7 аминокислот.
  139. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–138, в которой АСС характеризуется по меньшей мере 500-кратным снижением активности интерлейкина по сравнению с соответствующим контрольным интерлейкином.
  140. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–139, в которой СР1 представляет собой интерлейкин, а контрольный интерлейкин представляет собой рекомбинантный интерлейкин.
  141. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–139, в которой АСС дополнительно содержит пептидную маску (РМ1) и расщепляемый фрагмент (СМ3), расположенный на N-конце СР1.
  142. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–141, в которой активность интерлейкина представляет собой антипролиферативную активность в клетках лимфомы.
  143. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–141, в которой активность интерлейкина представляет собой индукцию секретуемой продукции эмбриональной щелочной фосфатазы в чувствительных к интерлейкину клетках НЕК293.
  144. АСС по любому из аспектов 114–143, в которой АСС дополнительно характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия протеазы, для которой СМ1 функционирует в качестве субстрата, причем отношение интерлейкиновой активности контрольного интерлейкина к активности продукта расщепления составляет менее около 2, и при этом контрольный интерлейкин представляет собой соответствующий рекомбинантный интерлейкин дикого типа.
  145. АСС по аспекту 144, в которой ЕС50 продукта расщепления примерно такая же, как ЕС50 соответствующего рекомбинантного интерлейкина дикого типа.
  146. АСС по аспекту 114, в которой каждая из первой и второй мономерных конструкций содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислот 21–359 SEQ ID NO: 350 и SEQ ID NO: 351–356.
  147. АСС по аспекту 146, в которой АСС характеризуется по меньшей мере 200-кратным снижением активности интерлейкина по сравнению с интерлейкином дикого типа, и

при этом АСС дополнительно характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия uPA, причем продукт расщепления имеет по меньшей мере в 50 раз большую активность интерлейкина, чем интактная АСС, причем активность интерлейкина измеряют в анализе антипролиферативной активности с использованием клеток лимфомы или в анализе индукции продукции секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы с использованием чувствительных к интерлейкину клеток НЕК293.

148. АСС по аспекту 146 или 147, в которой АСС проявляет более низкую токсичность *in vivo* по сравнению с рекомбинантным человеческим IL-15.
149. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС), содержащая первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, в которой:
- (a) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый белок-цитокин (CP1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1);
  - (b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый белок-цитокин (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2);
  - (c) первая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу CP1, CM1 и DD1, дополнительно при этом:
    - (i) АСС содержит связывающую область (LR) из 7–10 аминокислот;
    - (ii) CP1 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 347,
    - (iii) CM1 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 349,
  - (d) дополнительно при этом:
    - (i) вторая мономерная конструкция является такой же, как и первая мономерная конструкция,
    - (ii) первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом через по меньшей мере одну дисульфидную связь, и
    - (iii) DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc человеческого IgG;
  - (e) DD1 и DD2 связываются друг с другом, образуя димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и
  - (f) АСС характеризуется сниженным уровнем активности IL-15 по сравнению с активностью IL-15 для рекомбинантного человеческого IL-15.
150. Композиция, содержащая АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–149.

151. Композиция по аспекту 150, в которой композиция представляет собой фармацевтическую композицию.
152. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащий по меньшей мере одну дозу композиции согласно аспекту 150 или 151.
153. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–149 или композиции по аспекту 150 или 151.
154. Способ по п. 153, в котором у субъекта идентифицировано или диагностировано злокачественное новообразование.
155. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит первый мономер АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–149.
156. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по аспекту 155.
157. Вектор по аспекту 156, в которой вектор представляет собой вектор экспрессии.
158. Клетка млекопитающего, содержащая нуклеиновую кислоту по аспекту 155 или вектор по аспекту 156 или 157.
159. Клетка млекопитающего по аспекту 158, в которой клетка млекопитающего представляет собой клетку НЕК293 или клетку СНО.
160. Способ производства АСС, включающий:
  - a. экспрессию АСС в клетке млекопитающего по аспекту 158 или 159; и
  - b. очистку экспрессированной АСС.
161. АСС по любому одному или комбинации из аспектов 114–149, в которой СМ1 функционирует в качестве субстрата для протеазы, которая сверхэкспрессируется в опухолевой ткани.
162. АСС по аспекту 114, в которой каждая из первой и второй мономерных конструкций содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 356.
163. АСС по аспекту 162, в которой первая и вторая мономерные конструкции идентичны и каждая содержит SEQ ID NO: 356.
164. Композиция, содержащая АСС по аспекту 162 или 163.
165. Композиция по аспекту 164, в которой композиция представляет собой фармацевтическую композицию.
166. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащий по меньшей мере одну дозу композиции согласно аспекту 165.
167. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту

- терапевтически эффективного количества АСС по аспекту 162 или композиции по аспекту 165.
168. Способ по п. 167, в котором у субъекта идентифицировано или диагностировано злокачественное новообразование.
169. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит первый мономер АСС по аспекту 162 или 163.
170. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по аспекту 169.
171. Вектор по аспекту 170, в которой вектор представляет собой вектор экспрессии.
172. Клетка млекопитающего, содержащая нуклеиновую кислоту по аспекту 169 или вектор по аспекту 170 или 171.
173. Клетка млекопитающего по аспекту 172, в которой клетка млекопитающего представляет собой клетку НЕК293 или клетку СНО.
174. Способ производства АСС, включающий:
- а) экспрессию АСС в клетке млекопитающего по аспекту 172 или 173; и
  - б) очистку экспрессированной АСС.

## **ПРИМЕРЫ**

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

### **Пример 1. Получение активируемых цитокиновых конструкций**

Активируемую цитокиновую конструкцию IFN- $\alpha$ 2b-1204DNI $\alpha$ 1-hIgG4 получали рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции этого АСС были идентичными, каждая из которых представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 309. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к С-концу сигнальную последовательность сигнальной последовательности каппа-цепи IgG мыши (остатки 1–20 SEQ ID NO:309), зрелый белок-цитокин, который соответствует человеческому интерферон альфа-2b (SEQ ID NO:1), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, линкер, имеющий аминокислотную последовательность, GGGS (SEQ ID NO:2), и DD, соответствующий Fc IgG человека (SEQ ID NO:4). Полипептид получали путем трансформации клетки-хозяина полинуклеотидом, имеющим последовательность SEQ ID NO: 310, с последующим культивированием полученных рекомбинантных клеток-хозяев. Димеризация полученных экспрессированных полипептидов привела к образованию активируемой цитокиновой конструкции IFN- $\alpha$ 2b 1204DNI $\alpha$ 1 hIgG4.

Активируемую цитокиновую конструкцию IFN- $\alpha$ -2b 1490DNI-hIgG4 также

получали рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции этого АСС также были идентичными, причем каждая из них представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 311. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций из этих АСС содержит от N-конца к С-концу сигнальную последовательность сигнальной последовательности каппа-цепи IgG мыши (остатки 1–20 SEQ ID NO:309), зрелый белок-цитокин, который соответствует человеческому интерферону альфа-2b (SEQ ID NO:1), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, линкер, имеющий аминокислотную последовательность, GGGG (SEQ ID NO:2), и DD, соответствующий Fc IgG человека (SEQ ID NO:4). Полипептид получали путем трансформации клетки-хозяина полинуклеотидом, имеющим последовательность SEQ ID NO: 312, с последующим культивированием полученных рекомбинантных клеток-хозяев. Димеризация полученных экспрессированных полипептидов привела к образованию активируемой цитокиновой конструкции IFN- $\alpha$ 2b 1204dl hIgG4.

Получали дополнительные активируемые цитокиновые конструкции, включающие в линкеры дополнительные пять аминокислотных остатков.

Проводили электрофорез активируемых цитокиновых конструкций и активированных цитокиновых конструкций, обработанных протеазой. На **Фиг. 15** изображен гель, на котором показаны результаты (слева направо): (1) АСС IFN- $\alpha$ 2b-1204DNIdl-hIgG4 («1204»); (2) MT-SP1-обработанная IFN- $\alpha$ 2b-1204DNIdl-hIgG4 («1204 MT-SP1»); (3) uPA-обработанная IFN- $\alpha$ 2b-1204DNIdl-hIgG4 («1204 uPA»); (4) IFN- $\alpha$ 2b-1204DNIdl-hIgG4 с добавлением пяти аминокислотных остатков к линкеру («1204+1»); (5) MT-SP1-обработанная IFN- $\alpha$ 2b-1204DNIdl-hIgG4 («1204+1 MT-SP1»); (6) uPA-обработанная IFN- $\alpha$ 2b-1204DNIdl-hIgG4 («1204+1 uPA»); (7) IFN- $\alpha$ -2b 1490DNI-hIgG4 («1490»); (8) MT-SP1-обработанная IFN- $\alpha$ -2b 1490DNI-hIgG4 («1490 MT-SP1»); и (9) uPA-обработанная IFN- $\alpha$ -2b 1490DNI-hIgG4 («1490 uPA»). Результаты позволяют предположить, что протеазы были эффективны при расщеплении расщепляемых фрагментов в активируемых цитокиновых конструкциях.

### **Пример 2. IFN-альфа-2b активность активируемых цитокиновых конструкций**

Для проверки активности АСС, описанных в Примере 1, использовали клеточный репортерный анализ интерферонов типа I человека.

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 $\alpha/\beta$ . 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. С помощью этого репортерного анализа активность АСС, содержащих IFN $\alpha$ -2b, сравнивали с активностью Sylatron® (пегинтерферон альфа-2b). Данные на **Фиг. 16** демонстрируют, что IFN $\alpha$ -2b активность АСС была значительно снижена по сравнению с IFN $\alpha$ -2b активностью Sylatron® (пегинтерферон альфа-2b).

Кроме того, данные на **Фиг. 7А** и **7В** демонстрируют, что активность (нерасщепленных) АСС можно модулировать путем изменения длины линкера или связывающей области. Данные на **Фиг. 7А-7В** демонстрируют результаты для слитых конструкций IFN $\alpha$ -2b-Fc hIgG4 с различной длиной линкера или без линкера между IFN $\alpha$ -2b и Fc hIgG4, как было проверено в репортерном анализе с использованием HEK293. Слитые белки, протестированные в этом эксперименте, включают в направлении от N-конца к C-концу последовательность зрелого цитокина IFN $\alpha$ -2b, необязательный линкер и/или расщепляемый фрагмент и домен Fc человеческого IgG4 SEQ ID NO: 4 (включая полную шарнирную область, такую, что N-конец последовательности Fc начинается с аминокислотной последовательности ESKYGPCCPPC...). Первая конструкция (связывающая область = 7) не имеет линкера или расщепляемого фрагмента; ее последовательность в направлении от N-конца к C-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 4. Вторая конструкция (связывающая область = 12) содержит линкер SGGGG из 5 аминокислот (SEQ ID NO: 335); ее последовательность в направлении от N-конца к C-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 335, слитой с SEQ ID NO: 4. Третья конструкция (связывающая область = 18) включает CM из 7 аминокислот (SGRSDNI) и линкер из 4 аминокислот GGGG; ее последовательность в направлении от N-конца к C-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) включает линкер из 5 аминокислот, CM из 7 аминокислот и линкер из 4 аминокислот; ее последовательность в направлении от N-конца к C-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 335, слитой с SEQ ID NO: 100, слитой с SEQ ID NO: 2, слитой с SEQ ID NO: 4. Пятая конструкция (связывающая область = 24) включает CM из 13 аминокислот

(ISSGLLSGRSDNI) и линкер из 4 аминокислот; ее последовательность в направлении от N-конца к C-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.

### Пример 3. Активность обработанных протеазой ACC

Обработанные протеазой ACC, содержащие IFN $\alpha$ -2b, тестировали на антипролиферативные ответы с использованием клеток лимфомы Daudi в клеточном репортерном анализе, чтобы определить, можно ли восстановить активность.

Для расщепления димеризующегося домена ACC, содержащие IFN $\alpha$ -2b, обрабатывали в течение ночи при 37°C рекомбинантными человеческими протеазами, такими как активатор пламиногена урокиназного типа (uPA) или матриптаза (MT-SP1). Коктейль ингибиторов протеаз добавляли для нейтрализации протеаз перед тестированием активности, как описано в Примерах 2 и 3. Результаты этих анализов демонстрируют, что обработка протеазами ACC, содержащих IFN $\alpha$ -2b, может восстановить активность до уровня, сравнимого с активностью рекомбинантного цитокина. Значения EC50 для ACC IFN $\alpha$ -2b-1204DNIdl-hIgG4, ACC IFN $\alpha$ -2b-1204DNIdl-hIgG4 + uPA и IFN $\alpha$ -2b от Stem Cell (рекомбинантный человеческий IFN-альфа 2b, доступный от StemCell Technologies, кат. № 78077.1) рассчитывали по результатам анализа апоптоза клеток Daudi представлены ниже в таблице 3.

Таблица 3. EC50: Анализ апоптоза клеток Daudi

	IFN $\alpha$ -2b- 1204DNIdl-hIgG4 (ACC)	IFN $\alpha$ -2b- 1204DNIdl-hIgG4 (ACC) + uPA	IFN $\alpha$ -2b от StemCell
EC50	131,8	0,5701	0,3664

Значения EC50 для ACC IFN $\alpha$ -2b-1204DNIdl-hIgG4, ACC IFN $\alpha$ -2b-1204DNIdl-hIgG4 + uPA и IFN $\alpha$ -2b от StemCell были рассчитаны на основе результатов анализа IFN $\alpha$ / $\beta$  и представлены ниже в таблице 4.

Таблица 4. EC50: Репортерный анализ IFN $\alpha$ / $\beta$

	IFN $\alpha$ -2b- 1204DNIdl- hIgG4 (ACC)	IFN $\alpha$ -2b- 1204DNIdl- hIgG4 (ACC) + uPA	Sylatron <sup>®</sup>	Коммерческий IFN $\alpha$ -2b
EC50	393,1	0,4611	3,019	1,280

Эти результаты демонстрируют, что без присутствия активирующей протеазы активность IFN $\alpha$ -2b-1204DNI $\alpha$ 1-hIgG4 значительно снижается по сравнению с контролем IFN $\alpha$ -2b.

#### **Пример 4. Переносимость и активность АСС in vivo**

Человеческий IFN $\alpha$ -2b перекрестно реагирует с рецептором IFN $\alpha$  хомяка, и ранее было показано, что он активен у хомяков (Altrock et al, Journal of Interferon Research, 1986). Для оценки переносимости АСС ProC440, содержащего IFN $\alpha$ -2b, сирийским золотым хомякам вводили начальную дозу 0,4 мг/кг. Животные получали одну дозу исследуемого соединения и продолжали исследование в течение 7 дней после введения дозы, если не была выявлена непереносимая токсичность (DLT означает дозолIMITирующую токсичность). Начальная доза (0,4 мг/кг («миллиграмм на килограмм»)) представляет собой эквивалентную дозу INF $\alpha$ -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). (У яванских макаков (суно) применение 0,1 мг/кг/день INF $\alpha$ -con было связано с потерей массы тела, снижением потребления пищи и подавлением функции костного мозга (что соответствует 1,25-2,5 x 10<sup>7</sup> ЕД для хомяка массой 125 граммов)). 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 вводили АСС, имеющий структуру димеров DD-СМ-СР (ProC286) от N-конца к С-концу. В качестве отрицательного контроля животным вводили IgG4 человека. Отрицательный контроль не вызывал у животных какой-либо токсичности, как и ожидалось.

ProC286 (ChIgG4 5AA 1204DNI $\alpha$ 1 IFN $\alpha$ 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: 320 и сигнальную последовательность на его N-конце. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к С-концу сигнальную последовательность, домен

димеризации, соответствующий Fc человеческого IgG (SEQ ID NO: 3), линкер (SEQ ID NO: 321), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, линкер (SEQ ID NO: 2) и зрелый белок-цитокин, который соответствует человеческому интерферону альфа-2b (SEQ ID NO: 1).

ProC291 (NhIgG4 5AA 1204DNI<sub>d</sub>L IFN $\alpha$ 2b) также получали рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции были идентичны. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к C-концу зрелый белок-цитокин, который соответствует интерферону альфа-2b человека (SEQ ID NO: 1), линкер (SEQ ID NO: 321), CM (SEQ ID NO: 100), линкер (GGGS) (SEQ ID NO: 2) и область Fc IgG4 человека, включающую полную шарнирную последовательность (SEQ ID NO: 4).

Активность ProC286 и ProC291 сравнивали с активностью Sylatron® (PEG-IFN-alpha2b) в анализе апоптоза клеток Daudi (**Фиг. 17А-17В**). В этом анализе ProC286 и Sylatron® продемонстрировали схожие уровни активности, как показано на **Фиг. 17А**. Это указывает на то, что активность ProC286 аналогична коммерчески доступному пегилированному IFN-alpha2b, и его можно использовать в качестве суррогатного контроля Sylatron® оценки переносимости IFN $\alpha$ -2b в исследовании на хомяках. ProC291 продемонстрировал сниженную 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 начальную дозу 0,4 мг/кг. В течение одной недели продолжали исследование на животных, если не было достигнуто непереносимой дозы (DLT). Клинические наблюдения, массу тела и температуру измеряли перед введением дозы, а также через 6, 24, 72 часа и 7 дней после введения дозы для каждого животного. Образцы крови для гематологического и биохимического анализа собирали через 72 часа и 7 дней после введения дозы для каждого животного. Гематологический и биохимический анализы проводили сразу после отбора образцов. 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, аспаратаминотрансферазы, кальция, хлоридов, холестерина, креатинкиназы, креатина, гамма-глутаминотрансферазы, глобулина, глюкозы, неорганического фосфора, калия, натрия, общего билирубина, общего белка, триглицеридов, мочевины, азота и С-реактивного белка. Доказательства токсичности в исследовании переносимости обобщены на **Фиг. 18-20**.

В целом, животные, которым вводили немаскированные конструкции ProC286, демонстрировали в среднем 5% потерю массы тела при введении дозы в 2 мг/кг и 15% потерю массы тела при введении дозы в 10 мг/кг и 15 мг/кг (**Фиг. 18**). У одного животного, которому вводили ProC286 в дозе 15 мг/кг, через 7 дней после введения дозы (конец исследования) наблюдали потерю массы тела на 20%. Это считается непереносимой дозой. Напротив, у животных, которым вводили ProC440 в дозе 2 и 10 мг/кг, не наблюдали потерю массы тела.

Животные, которым вводили ProC440 в дозе 15 мг/кг, показали потерю массы тела в среднем на 5% (**Фиг. 18**). Это указывает на то, что АСС по настоящему изобретению с димеризованной структурой, начиная с N-конца, CP-СМ-DD неожиданно ограничивают опосредованную IFN $\alpha$ -2b потерю массы тела. 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 пегилированным IFN $\alpha$ -2b (Sylatron®) или ProC286.

С точки зрения клинической биохимии, у животных, которым вводили ProC286, наблюдалось значительное повышение уровня щелочной фосфатазы (ЩФ) при всех дозах (0,4 мг/кг, 2 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг) через 7 дней после введения дозы (конец исследования) (**Фиг. 19**). Не было зафиксировано значительного увеличения уровня ЩФ, когда животным вводили 10 или 15 мг/кг ProC440 (**Фиг. 19**). Повышение уровня АЛТ является маркером гепатотоксичности. Было показано, что IFN $\alpha$ -2b вызывает токсичность для печени. Это указывает на то, что АСС по настоящему изобретению с димеризованной структурой, начиная с N-конца, CP-СМ-DD неожиданно ограничивают опосредованную IFN $\alpha$ -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. 20**). Это

снижение напоминает опосредованную IFNa-2b миелотоксичность. Через три дня после введения дозы у животных, которым вводили ProC440, наблюдали снижение уровня количества ретикулоцитов, количества нейтрофилов и количества лейкоцитов (WBC) (Фиг. 20). В целом уровень снижения количества гемопоэтических клеток, наблюдаемый у животных, получавших дозы ProC440, не столь значителен, как уровни снижения, наблюдаемые у животных, получавших дозу ProC286. Через 7 дней после введения дозы (окончание исследования) у животных, получавших дозы 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. 20). У животных, получавших ProC286, уровень количества ретикулоцитов, нейтрофилов и лейкоцитов (белых кровяных телец) остается низким. Это указывает на то, что АСС по настоящему изобретению с димеризованной структурой, начиная с N-конца, CP-СМ-DD неожиданно ограничивают опосредованную IFNa-2b миелотоксичность.

**Пример 5. Характеристика дополнительных цитокиновых конструкций IFNa-2b *in vitro***

Дополнительные активируемые цитокиновые конструкции, содержащие IFNa-2b, также были получены рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции этих АСС были идентичны. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к С-концу сигнальную последовательность сигнальной последовательности каппа-цепи IgG мыши (остатки 1–20 SEQ ID NO: 309), зрелый белок-цитокин, соответствующий интерферону альфа-2b человека (SEQ ID NO: 1), расщепляемый фрагмент (СМ), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и домен димеризации, соответствующий Fc человеческого IgG4 S228P (содержащий SEQ ID NO: 3). Кроме того, эти АСС включают или не включают линкер, имеющий аминокислотную последовательность SGGGG (SEQ ID NO: 335) между CP и СМ. Эти АСС включают или не включают линкер, имеющий аминокислотную последовательность GGGS (SEQ ID NO: 2) между СМ и DD. Эти АСС также содержат или не содержат части шарнира DD, которые являются N-концевыми по отношению к цистеину 226. Эти дополнительные активируемые цитокиновые конструкции описаны в таблице 6 (см. SEQ ID NO: 336–342 и SEQ ID NO: 313).

**Таблица 6: Активируемые цитокины, имеющие разную длину аминокислотных последовательностей между CP и цистеином 226 человеческого IgG**

Назва	Альтернативное	Линкер	Линкер между	N-концевые	ДЛИНА
-------	----------------	--------	--------------	------------	-------

ние	название	между CP и CM	CM и DD	остатки шарнира Fc	СВЯЗЫВАЮЩЕЙ ОБЛАСТИ
ProC28 8	IFNa2b 1204DNI 0AA Fc	SGGGG (SEQ ID NO: 335)	отсутствует	отсутствует	12
ProC28 9	IFNa2b 1204DNI 3AA Fc	SGGGG (SEQ ID NO: 335)	отсутствует	GPP	15
ProC29 0	IFNa2b 1204DNI 7AA Fc	SGGGG (SEQ ID NO: 335)	отсутствует	ESKYGPP (SEQ ID NO: 389)	19
ProC29 1	IFNa2b 1204DNI 11AA Fc	SGGGG (SEQ ID NO: 335)	GGGS (SEQ ID NO: 2)	ESKYGPP (SEQ ID NO: 389)	23
ProC44 0	N IFNa2b 0 1204DNIdL 0AA Fc	отсутствует	отсутствует	отсутствует	7
ProC44 1	N IFNa2b 0 1204DNIdL 3AA Fc	отсутствует	отсутствует	GPP	10
ProC44 2	N IFNa2b 0 1204DNIdL 7AA Fc	отсутствует	отсутствует	ESKYGPP (SEQ ID NO: 389)	14
ProC44 3	N IFNa2b 0 1204DNIdL 11AA Fc	отсутствует	GGGS (SEQ ID NO: 2)	ESKYGPP (SEQ ID NO: 389)	18

Активность ProC440, ACC без гибкого линкера и области Fc, укороченной до Cys226, а также активность дополнительных ACC, содержащих различные линкеры и последовательности области Fc, тестировали *in vitro* с использованием чувствительных к IFN клеток HEK293 и клеток Daudi, как описано ранее. В обоих анализах активность (например, антипролиферативный эффект) ProC440 была снижена по сравнению с таковой для всех других ACC, содержащих различные дополнительные последовательности между цитокином и первой аминокислотой, которая связывает DD с соответствующим вторым мономером (т. е. Cys226). Значения EC50 для ACC были рассчитаны на основе результатов анализа IFN $\alpha/\beta$  и представлены ниже в таблице 7.

**Таблица 7. EC50: Репортерный анализ IFN $\alpha/\beta$**

	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 путем изменения длины аминокислотных последовательностей между цитокином и Cys226 DD.

Не желая быть связанными теорией, на основании представленных в данном документе результатов авторы изобретения предполагают, что позиционирование N-конца цитокина DD и применение относительно короткого LR ингибирует цитокиновую активность для цитокинов в дополнение к цитокинам в виде интерферона-альфа, представленным в приведенных выше конкретных примерах.

**Пример 6. Характеристика *in vitro* иллюстративных цитокиновых конструкций IL-15**

Активируемую цитокиновую конструкцию, содержащую человеческий IL-15 (ProC1471), получали рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции ProC1471 были идентичными, каждая из которых представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 350 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 сигнальной последовательности каппа-цепи IgG мыши (остатки 1–20 SEQ ID NO: 309), зрелый белок-цитокин, который соответствует аминокислотным остаткам 49–161 человеческого IL-15 (SEQ ID NO: 347), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и домен димеризации, соответствующий Fc IgG4 человека, укороченный по Cys226 (согласно нумерации EU) и включающий мутацию S228P (SEQ ID NO: 3) (**Фиг. 3**). Полная последовательность мономерной конструкции ProC1471, включая сигнальную последовательность, показана в SEQ ID NO: 350. Связывающая область (LR) этой мономерной конструкции имеет длину 7 аминокислот.

Полипептид получали путем трансформации клетки-хозяина полинуклеотидом,

имеющим последовательность SEQ ID NO: 357, с последующим культивированием полученных рекомбинантных клеток-хозяев. Димеризация полученных экспрессированных полипептидов позволяла получить цитокиновую конструкцию ProC1471.

Активность ProC1471 тестировали *in vitro* с использованием чувствительных к IL-2/IL-15 клеток HEK293. См. **Фиг. 4** и **6**. Чувствительные к IL-2/IL15 клетки HEK293 были получены путем стабильной трансфекции генами CD25 человека (IL-2R $\alpha$ ), CD122 (IL-2R $\beta$ ) и CD132 (IL-2R $\gamma$ ), а также генами JAK3 и STAT5 человека для получить полностью функциональный сигнальный путь IL-2/IL-15. Клетки также содержат репортерный ген индуцируемый STAT5 SEAP (секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза). Для поддержания экспрессии трансгена клетки культивировали в среде DMEM GlutaMax с добавлением 10% FBS, Pen/Strep, 10 мкг/мл пурамицина и 100 мкг/мл нормоцина. Добавление IL-2 и IL-15 к этим клеткам активирует STAT5 и впоследствии индуцирует выработку SEAP, которую можно легко оценить в супернатанте с использованием раствора QUANTI-Blue, колориметрического определения активности щелочной фосфатазы.

Чувствительные к IL-2/IL-15 клетки HEK293 готовили в концентрации 280000 клеток/мл в среде DMEM, дополненной 10% FBS, и аликвоты по 180 мкл переносили пипеткой в лунки белого плоскодонного 96-луночного планшета (50000 клеток/лунка). Исследуемые цитокины разводили в среде DMEM с добавлением 10% FBS. Получали повторности трехкратных серийных разведений, из которых в каждую лунку добавляли по 20 мкл. После 20–24 часов инкубации при 37°C 20 мкл супернатанта индуцированных репортерных клеток переносили в лунки плоскодонного 96-луночного планшета. В каждую лунку добавляли по 180 мкл ресуспендированного раствора QUANTI-Blue. После инкубации планшета в инкубаторе при 37°C в течение 1–3 часов уровни SEAP измеряли с использованием спектрофотометра при длине волны 620 нм. Были построены кривые доза-ответ, и значения EC50 были получены с помощью сигмоидальной аппроксимирующей нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism.

В репортерном анализе активность ProC1471 была снижена по меньшей мере в 250X (в 250 раз) по сравнению с IL-15 от PeproTech (рекомбинантный человеческий IL-15, доступный от PeproTech, кат. № 200-15) (**Фиг. 4**). Это указывает на то, что слияние расщепляемого домена димеризации, соответствующего Fc IgG человека, обеспечивает стерическую маскировку IL-15 в конструкции АСС.

#### **Пример 7. Активность обработанного протеазой IL-15-содержащей АСС**

Обработанную протеазой IL-15-содержащую АСС тестировали в репортерном анализе, чтобы определить, можно ли восстановить активность интерлейкина. Для

расщепления димеризующегося домена IL-15-содержащую АСС обрабатывали в течение ночи при 37°C рекомбинантными человеческими протеазами, такими как активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) или матриптаза (MT-SP1). Расщепление uPA в ожидаемом сайте расщепляемого фрагмента было подтверждено электрофорезом (Фиг. 5). Результаты демонстрируют, что протеаза uPA может расщеплять расщепляемые фрагменты (СМ) в ProC1471. Активация протеазы uPA частично восстанавливала активность ProC1471 до уровня, близкого, но ниже, чем у рекомбинантного IL-15 (Фиг. 6). Значения EC50 для ProC1471, ProC1471 + uPA и IL-15 от PeproTech были рассчитаны на основе результатов репортерного анализа IL-15 и представлены ниже в таблице 9. Таким образом, активация АСС с помощью протеазы uPA приводила к активности IL-15, которая примерно в 64 раза превышала активность интактной АСС. Отношение EC50 (продукт расщепления) к EC50 (контрольный уровень дикого типа) для ProC1471 при активации uPA составляет около 6 ( $9,046/1,48 = 6,11$ ), что демонстрирует хорошее восстановление активности IL-15 после активации протеазой.

**Таблица 9.** EC50: Репортерный анализ HEK-Blue

	ProC1471	ProC1471 + uPA	IL-15 от PeproTech
EC50 (пМ)	573,8	9,046	1,480

### **Пример 8. Дизайн дополнительных цитокиновых конструкций IL-15**

Дополнительные активируемые цитокиновые конструкции ProC1874, ProC1875, ProC1876, ProC1877, ProC1878 и ProC1879 также были получены рекомбинантными методами. 1-я и 2-я мономерные конструкции этих АСС были идентичны. Каждая из 1-й и 2-й мономерных конструкций содержит от N-конца к С-концу сигнальную последовательность сигнальной последовательности каппа-цепи IgG мыши (остатки 1–20 SEQ ID NO: 309), зрелый белок-цитокин, который соответствует остаткам 49–162 человеческого IL-15 (SEQ ID NO: 348), расщепляемый фрагмент (СМ) и домен димеризации, соответствующий Fc IgG4 человека, укороченный по Cys226 (согласно нумерации EU) и включающий мутацию S228P (SEQ ID NO: 3). Кроме того, эти АСС включают или не включают линкер между цитокином и СМ, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 10 ниже. Эти дополнительные активируемые цитокиновые конструкции описаны в таблице 10, а полные аминокислотные последовательности этих конструкций представлены в таблице 14 (см. SEQ ID NO: 351–356).

**Таблица 10.** Активируемые цитокины, имеющие разные линкеры и СМ

Название	Альтернативное название	Линкер между СР и СМ	Длина связывающей области	СМ
ProC1471	IL-15(NT)_1204DNI <sub>IdL</sub> _IgG4(C226)	отсутствует	7	SEQ ID 100
ProC1874	IL-15_(0aa)_1204DNI_IgG4(C226)	отсутствует	8	SEQ ID 40
ProC1875	IL-15_(1aa)_1204DNI_IgG4(C226)	G	9	SEQ ID 40
ProC1876	IL-15_(2aa)_1204DNI_IgG4(C226)	GG	10	SEQ ID 40
ProC1877	IL-15_(0aa)_1205_IgG4(C226)	отсутствует	7	SEQ ID 349
ProC1878	IL-15_(1aa)_1205_IgG4(C226)	G	8	SEQ ID 349
ProC1879	IL-15_(2aa)_1205_IgG4(C226)	GG	9	SEQ ID 349

### Пример 9. Характеристика дополнительных АСС, содержащих IL-15

Содержащие IL-15 АСС ProC1471, ProC1876 и ProC1879 обрабатывали в течение ночи при 37°C рекомбинантной uPA. Расщепление uPa в ожидаемом сайте расщепляемого фрагмента было подтверждено с помощью электрофореза (Фиг. 21А). Репортерный анализ НЕК293 характеризует активность интактных и обработанных протеазой содержащих IL-15 АСС (Фиг. 21В). В таблице 11 показаны средние значения EC<sub>50</sub> содержащих IL-15 АСС для нескольких экспериментов (n>3). Активация АСС с помощью протеазы uPa приводила к активности IL-15, которая примерно в 49–104 раза превышала активность интактных АСС.

Таблица 11. EC<sub>50</sub>: Репортерный анализ НЕК-Blue

	Intact ACC EC <sub>50</sub> (pM)	Activated ACC EC <sub>50</sub> (pM)	Activity fold-change intact ACC/ activated treated ACC
IL-15	1,46		
ProC1471	729,23	14,80	49
ProC1876	1111,73	17,63	63
ProC1879	2561,00	24,53	104

### Пример 10. Активность содержащих IL-15 АСС в отношении пролиферации РВМС человека

В анализе клеточной пролиферации РВМС человека инкубировали с рекомбинантным IL-15 или IL-15-АСС (с предварительной активацией протеазы или без нее) в течение 3 дней. После инкубации РВМС окрашивали фиксируемым красителем для

определения жизнеспособности eFluor™780, анти-CD3-FITC (UCHL1), анти-CD4-BV608 (RPA-T4), анти-CD8-BV480 (RPA-T8), анти-CD56-BV421 (HCD56) и анти-Ki67-APC (Ki67). Анализировали различные популяции клеток, включая CD3-, CD56+ NK-клетки, CD3+, CD8+ Т-клетки и CD3+, CD4+ Т-клетки, и на основе процентной экспрессии Ki67 определяли пролиферацию различных популяций клеток, как показано на **Фиг. 22**. Обработанные протеазой IL-15-АСС проявляют более сильную пролиферативную активность, чем соответствующие интактные содержащие IL-15 АСС. В таблице 12 показаны ЕС50 различных содержащих IL-15 АСС в анализе пролиферации РВМС.

**Таблица 12. ЕС50: Пролиферация РВМС человека, Ki67**

ЕС50 (нМ)	НК-клетки	CD8	CD4
IL-15	0,004	0,221	0,121
ProC1471+uPA	0,027	1,262	1,080
ProC1876+uPA	0,112	6,793	4,556
ProC1879+uPA	0,084	4,088	3,362
ProC1471	11533	589,4	287,6
ProC1876	29,415	442,35	313,3
ProC1879	883,25	2.57E+10	857,4

**Пример 11. Активность содержащих IL-15 АСС на фосфорилирование STAT5 РВМС человека**

Связывание IL-15 с IL-15R приводит к фосфорилированию STAT5 и последующей пролиферации NK- и Т-клеток. В анализе фосфорилирования STAT5 РВМС человека сначала окрашивали анти-CD3-FITC (UCHL1), анти-CD4-BV608 (RPA-T4), анти-CD8-BV480 (RPA-T8), анти-CD56-BV421 (HCD56) в течение 30 минут при комнатной температуре. После поверхностного окрашивания клетки стимулировали различными исследуемыми соединениями IL-15 в течение 20 минут при 37°C в среде RPMI, содержащей 10% FBS. Клетки сразу фиксировали предварительно нагретым раствором для фиксации в течение 10–12 минут при 37°C, промывали и инкубировали с предварительно охлажденным (-20°C) 90% метанолом в течение 30 минут при 4°C. После фиксации и пермеабиллизации клетки снова промывали и окрашивали анти-pSTAT5-Alexa647 (pY687). Различные популяции клеток, включая CD3-, CD56+ NK-клетки, CD3+, CD8+ Т-клетки и CD3+, CD4+ Т-клетки, анализировали, а фосфорилирование STAT5 в различных популяциях клеток определяли в виде процента pSTAT5-положительных клеток (**Фиг. 23**). ЕС50 для фосфорилирования STAT5 IL15-АСС в различных популяциях клеток обобщено в таблице

13.

**Таблица 13. EC50: Фосфорилирование STAT5 PBMC человека**

EC50 (нМ)	НК-клетки	CD8	CD4
IL-15	1,791	6,404	6,972
ProC1471+uPA	106,2	163,6	582
ProC1879+uPA	93,1	216,1	319,8
ProC1471	11560	40160	140700
ProC1879	14150	18980	19460

**Таблица 14. Примеры последовательностей**

SEQ ID NO:	Название	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	Интерферон-альфа-2b человека	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
2	Линкер	GGGS
3	Область Fc IgG4 человека с мутацией S228P, укороченная до Cys226	CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSL
4	Область Fc IgG4 человека с мутацией S228P и полной шарнирной областью	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL
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	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW

		EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
102	Интерферон альфа-2 крысы	CDLPHTHNLRNKRAFTLLAQMRRRLSPVSCLKDRK DFGFPLEKVDGQQIQKAQAIPVLHELTTQQLSLFTS KESSTAWDASLLDSFCNDLQQQLSGLQACLMQQV GVQESPLTQEDSLLAVREYFHRITVYLREKKHSPC AWEVVRAEVWRALSSSANLLGRLREERNES
103	Интерферон альфа-2 мышь	CDLPHTYNLRNKRALKVLAAQMRRRLPFLSCLKDRQ DFGFPLEKVDNQQIQKAQAIPVLRDLTQQTLNLFT SKASSAAWNATLLDSFCN DLHQQLNDLQ TCLMQQVGVQ EPPLTQEDAL LAVRKYFHRITVYLREKKHS PCAWEVVRAE VWRALSSSVN LLPRLSEEKE
104	Интерферон альфа-2b человека	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
105	Интерферон альфа-n3 человека	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKECDLPQTHSLGS RRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFQEEFGNQ FQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLD KFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMNEDSIL AVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFS LSTNLQESLRSKECDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMR RISLFSCLKDRRDFGFQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLN DLEACVIQGVGVTTETPLMNEDSILAVRKYFQRITL YLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRS KE
106	Интерферон бета-1a человека	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKD RMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIF

		RQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEK LEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYS HCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN
107	Интерферон бета-1b человека	SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDR MNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI FAIFR QDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKL EKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSH CAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN
108	Интерферон бета мышь	MNNRWILHAAFLLCFSTTALSINYKQLQLQERTNI RKCQELLEQLNGKINLTYRADFKIPMEMTEKMOK SYTAFAIQEMLQNVFLVFRNNSSTGWNETIVVRL LDELHQQT VFLKTVLEEKQEERLTWEMSSTALHL KSYYWRVQRYLKLKMKYNSYAWMVVRAEIFRNFL IIRRLTRNFQN
109	Интерферон бета крысы	MANRWTLHIAFLLCFSTTALSIDYKQLQFRQSTSIR TCQKLLRQLNGRLNLSYRTDFKIPMEVMHPSQME KSYTAFAIQVMLQNVFLVFRSNFSSTGWNETIVES LDELHQQTELEIILKEKQEERLTWVTSTTTLGLK SYYWRVQRYLKDKKYNSYAWMVVRAEVFRNFSI ILRLNRNFQN
110	Интерферон омега человека	MCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRI SPFLCLKDRR DFRFPQEMVKGSQKQKAHVMSVLHEMLQQIFSLF HTERSSAAWNMTLLDQLHTGLHQQLQHLETCLLQ VVGEGESAGAISSPALTRRYFQGIRVYLKEKKYS DCAWEVVRMEIMKSLFLSTNMQERLRSKDRDLGS S
111	IL-1 альфа человека	MAKVPDMFEDLKNCYSENEEDSSSIDHLSLNQKSF YHVSYGPLHEGCMQSVSLSISSETSKTSLTFKES MVVVATNGKVLKKRRLSLSQSITDDDL EAIANDSE EEIIPRSAPFSFLSNVKYNFMRIIKYEFILNDALNQ SIIRANDQYLTAALHNLDEAVKFDMGAYKSSKD DAKITVILRISK TQLYVTAQDEDQPVLLKEMPEIPK TITGSETNLLFFWETHGKKNYFTSVAHPNLFIATKQ DYWVCLAGGPPSITDFQILENQA

112	IL-1 альфа мыши	<p>MAKVPDFLFDLKNCSYSENEYSSAIDHLSLNQKSF  YDASYGSLHETCTDQFVSLRTSETSKMSNFTFKES  RVTVSATSSNGKILKKRRLSFSETFTEDDLQSITHD  LEETIQPRSAPYTYQSDLRYKLMKLVKQKFMND  SLNQTIYQDVDKHYLSTTWLNDLQQEVKFDMYA  YSSGGDDSKYPVTLKISDSQLFVSAQGEDQPVLK  ELPETPKLITGSETDLIFFWKSINSKNYFTSAAYPEL  FIATKEQSRVHLARGLPSMTDFQIS</p>
113	IL-1 бета человека	<p>MAEVPPELASEMMAYYSGNEDDLFFEADGPKQMK  CSFQDLDLCPDGGIQLRISDHHYSKGRQAASVV  VAMDKLRKMLVPCPQTFQENDLSTFFPFIFEEPIF  FDTWDNEAYVHDAPVRSNLCTLRDSQQKSLVMS  GPYELKALHLQGQDMEQQVVFMSFVQGEESND  KIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKN  YPKKKMEKRFVFNKIEINNKLEFESAQFPNWIYSTS  QAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS</p>
114	IL-1 бета мыши	<p>MATVPELNCMPFSDSDENDLFFEVDGPQKMKGC  FQTFDLGCPDESIQLQISQQHINKSFRQAVSLIVAVE  KLWQLPVSFPWTFQDEDMSTFFSFIFEEPIPCDSW  DDDDNLLVCDVPIRQLHYRLRDEQQKSLVLSDPY  ELKALHLNGQNINQQVIFSMSFVQGEPSNDKIPVA  LGLKGKNLYLSCVMKDGTPTLQLESVDPKQYPPK  KMEKRFVFNKIEVKSKEFESAEFPNWIYSTSQAE  HKPVFLGNNSGQDIIDFTMESVSS</p>
115	IL-1RA человека	<p>MEICRGLRSHLITLLLFLFHSETICRPSGRKSSKMQ  AFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGNVNLEEK  IDVVPIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGETRLQLE  AVNITDLSNRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACP  GWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQ  DE</p>
116	IL-1RA мыши	<p>MEICWGPYSHLISLLLILLFHSEAACRPSGKRPKM  QAFRIWDTNQKTFYLRNNQLIAGYLQGNIKLEEK  IDMVPIDLHSVFLGIHGGKLCLSCAKSGDDIKLQLE  EVNITDLSKNKEEDKRFTFIRSEKGPPTTSFESAACP</p>

		GWFLCTTLEADRPVSLTNTPEEPLIVTKFYFQEDQ
117	IL-18 человека	MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLES DYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMT DSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEK ISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPG HDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDE LGDRSIMFTVQNEDE
118	IL-18 мыши	MAAMSEDSVCVNFKEMMFIDNTLYFIPEENGDLSD NFGRLHCTTAVIRNINDQVLFVDKRQPVFEDMTDI DQSASEPQTRLIIYMYKDSEVRGLAVTLVSKDSKM STLSCKNKIISFEEMDPPENIDDIQSDLIFFQKRVP HNKMEFESSLYEGHFLACQKEDDAFKLILKKKDE NGDKSVMFTLTNLHQS
119	IL-2 человека	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLE HLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFCQSIIS
120	IL-2 мыши	MYSMQLASCVTTLTLVLLVNSAPTSSSTSSSTAEAQ QQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNL KLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHV LDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFE CQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ
121	IL-4 человека	MGLTSQLLPPLFFLLACAGNFVHGHC DITLQEIIK TLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFCRA ATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFL KRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLK TIMREKYSKCSS
122	IL-4 мыши	MGLNPQLVVILLFFLECTRSHIHGCDKNHLREIIGIL NEVTGEGTPCTEMDVPNVLTATKNTTESELVCRAS KVLRIFYLKHGKTPCLKKNSSVLMELQRLFRAFRC LDSSISCTMNESKSTSLKDFLESLSKSIMQMDYS
123	IL-7 человека	MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQ

		YESVLMV SIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHIC DANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLK VSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEEN KSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTK EH
124	IL-7 мыши	MFHVSFRYIFGIPPLILVLLPVTSSSECHIKDKEGKAY ESVLMISIDELDKMTGTDSNCPNNEPNFFRKHVCD DTKEAAFLNRAARKLKQFLKMNISEEFNVHLLTVS QGTQTLVNCTSKEEKNVKEQKNDACFLKRLLE IKTCWNKILKCSI
125	IL-9 человека	MLLAMVLTSAALLCSVAGQGCPTLAGILDINFLIN KMQEDPASKCHCSANVTSCCLGIPSDNCTRPCFS ERLSQMTNTTMQTRYPLIFSRVKKSVEVLKNNKCP YFSCEQPCNQTTAGNALTFLKSLLEIFQKEKMRGM RGKI
126	IL-9 мыши	MLVTYILASVLLFSSVLGQRCSTTWGIRDNYLIEN LKDDPPSKCSCSGNVTSCCLSVPTDDCTTPCYRE GLLQLTNATQKSRLLPVFHRVKRIVEVLKNITCPSF SCEKPCNQTMAGNTLSFLKSLLGTFQKTEMQRQK SRP
127	IL-13 человека	MHPLLNPLLLALGLMALLTTVIALTCLGGFASPG PVPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSIN LTAGMYCAALESINVS GC SAIEKTQRMLSGFCPH KVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKFLR EGRFN
128	IL-13 мыши	MALWVTAVLALACLGGLAAPGPVPRSVSLPLTLK ELIEELSNITQDQTPLCNGSMVWSVDLAAGGFCVA LDSL TNISNCNAIYRTQRILHGLCNRKAPTTVSSLP DTKIEVAHFITKLLSYTKQLFRHGPF
129	IL-15 человека	MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILG CFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATL YTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIH DTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNI

		KEFLQSFVHIVQMFINTS
130	IL-15 мыши	MKILKPYMRNTSISCYLCFLLNHFLTEAGIHVFIL GCVSVGLPKTEANWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTT LYTDSDFHPSCKVTAMNCFLELQVILHEYSNMTL NETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCKECEEELEEK TFTEFLQSFIRIVQMFINTS
131	IL-3 человека	MSRLPVLALLQLLVRPGLQAPMTQTTPLKTSWVN CSNMIDEIITHLKQPPLPLDFNNLNGEDQDILMEN NLRPNLEAFNRAVKSLQNASAIESILKNLLPCLPL ATAAPTRHPIHIKGDWNEFRKLTFFYLKTLENAQ AQQTTLAIF
132	IL-3 мыши	MVLASSTTSIHTMLLLLMLFHLGLQASISGRDTH RLTRTLNCSSIVKEIIGKLPPELKTDDDEGPSLRNKS FRRVNL SKFVESQGEVDPEDRYVIKSNLQKLNCC PTSANDSALPGVFIRDLDDFRKLRFYMVHLNDLE TVLTSRPPQPASGSVSPNRGTVEC
133	IL-5 человека	MRMLLHLSLLALGAAYVYAIPTEIPTSALVKETLA LLSTHRTLLIANETLRIPVPVHKNHQLCTEEIFQIG TLESQTVQGGTVERLFKNLSLIKKYIDGQKKKCGE ERRRVNQFLDYLQEFLGVMNTEWIIES
134	IL-5 мыши	MRRMLLHLSVLTLSVCVWATAMEIPMSTVVKETLT QLSAHRALLTSNETMRLPVPTHKNHQLCIGEIFQG LDILKNQTVRGGTVEMLFQNL SLIKKYIDRQKEKC GEERRRTRQFLDYLQEFLGVMSTEWAMEG
135	GM-CSF человека	MWLQSLLLLGTVAC SISAPARSPSPSTQPWEHVNA IQEARLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPT CLQTRLELYKQGLRGS LTKLKGPLTMMASHYKQH CPPTPETS CATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEP VQE
136	GM-CSF мыши	MWLQNLLFLGIVVYSLSAPTRSPITVTRPWKHVEA IKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLT CVQ TRLKIFEQGLRGNFTKLGALNMTASYYYQTYCPPT PETDCETQVTTYAD FIDSLKTFLTDIPFECKKPGQK

137	IL-6 человека	MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDS KDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETC NKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGF NEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESEEQARA VQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLT KLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQ M
138	IL-6 мышцы	MKFLSARDFHPVAFLGLMLVTTTAFPTSQVRRGDF TEDTTPNRPVYTTSQVGGGLITHVLWEIVEMRKELC NGNSDCMNNDDALAENNLKLPEIQRNDGCYQTG YNQEICLLKISSGLLEYHSYLEYMKNNLKDKNKKD KARVLQRDTETLIHIFNQEVEKDLHKIVLPTPISNAL LTDKLESQKEWLRTKTIQFILKSLEEFKVTLRSTR QT
139	IL-11 человека	MNCVCRLVLVVLSLWPDTAVAPGPPPGPPRVSPDP RAELDSTVLLTRSLADTRQLAAQLRDKFPADGD HNLDLPTLAMSAGALGALQLPGVLRRLRADLLS YLRHVQWLRRAGGSSLKTLEPELGTQARLDRL RRLQLLMSRLALPQPPDPPAPPLAPPSSAWGGIRA AHAILGGLHLTLDWAVRGLLLLKTRL
140	IL-11 мышцы	MNCVCRLVLVVLSLWPDRVVAPGPPAGSPRVSSD PRADLDSAVLLTRSLADTRQLAAQMRDKFPADG DHSLSLPTLAMSAGTLGSLQLPGVLRRLRVDLMS YLRHVQWLRRAGGPSLKTLEPELGALQARLERLL RRLQLLMSRLALPQAAPDQPVIPLGPPASAWGSIR AAHAILGGLHLTLDWAVRGLLLLKTRL
141	G-CSF человека	MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPL GPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVS CATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQ LAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTL QLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPA FASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHAQP
142	G-CSF мышцы	MAQLSAQRRMKLMALQLLLWQSALWWSGREAVPL VTVSALPPSLPLPRSFLKLSLEQVRKIQASGSVLE

		QLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPKASLSGCSSQAL QQTQCLSQLHSGLCCLYQGLLQALSGISPALAPTL LLQLDVANFATTIWQQMENLGVAPTQPTQSAMP AFTSAFQRRAGGVLAISYLQGFLETARLALHHLA
143	IL-12 альфа человека	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMF PCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFIT NGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKT MNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNS ETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDR VMSYLNAS
144	IL-12 бета человека	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVE LDWYDPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLQDSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSHLL LHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSG RFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAA TLAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQV QGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCS
145	IL-12 бета мыши	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVE VDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSQRHGV GSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLL HKKENGIWSTEILKNFKNKTFKCEAPNYSGRFTC SWLVQRNMDLKFNIKSSSSPDSRAVTCGMASLSA EKVTLQQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELA LEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLK NSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEK MKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQ AQDRYYNSSCSKWACVPCRVR
146	IL-12 альфа мыши	MCQSRYLLFLATLALLNHLSLARVIPVSGPARCLS QSRNLLKTTDDMVKTAREKCLKHYSCTAEDIDHEDI TRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSC

		LPPQKTSMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAAL QNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQ KPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVM GYLSSA
147	LIF человека	MKVLAAGVVPLLLVLHWKHGAGSPLPITPVNATC AIRHPCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTA QGEPFPNNLDKLCGPNVTDFFPFHANGTEKAKLVE LYRIVVYLGTSLGNITRDQKILNPSALSLSKLNAT ADILRGLLSNVLCRLCSKYHVGHVDVTYGPDTSG KDFVQKKKLGQCQLLGKYKQIIAVLAQAF
148	LIF мышцы	MKVLAAGIVPLLLLVLHWKHGAGSPLPITPVNATC AIRHPCHGNLMNQIKNQLAQLNGSANALFISYYTA QGEPFPNNVEKLCAPNMDFPSFHGNGTEKTKLVE LYRMVAYLSASLTNITRDQKVLNPTAVSLQVKLN ATIDVMRGLLSNVLCRLCNKYRVGHVDVPPVPDH SDKEAFQRKKLGCQLLGTYKQVISVVVQAF
149	OSM человека	MGVLLTQRTLTLVLAALLFPSMASMAAIGSCSKEY RVLLGQLQKQTDLMQDTSRLDPYIRIQGLDVPKL REHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGC VLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMA RPNILGLRNNIYCMAQLLDNSDTAEPKAGRGASQ PPTPTASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHSVGRVF SKWGESPNRSRRHSPHQALRKGVRRTRPSRKGKR LMTRGQLPR
150	OSM мышцы	MQTRLLRRTLLSLTLLILSMALANRGCSNSSSQLL SQLQNQANLTGNTESLLEPYIRLQNLNTPDLRAAC TQHSVAFPSEDTLRQLSKPHFLSTVYTTLDRVLYQ LDALRQKFLKTPAFPKLDSARHNILGIRNNVFCMA RLLNHSLEIPEPTQTDGASRSTTPDVFNKIGSCG FLWGYHRFMGSVGRVFREWDDGSTRSRRQSPLRA RRKGTRRIRVRHKGTRRIRVRRKGTRRIWVRRKGS RKIRPSRSTQSPTTRA
151	IL-10 человека	MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPG NLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLKES

		LLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDP DIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFLPCENKSKA VEQVKNFAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMT MKIRN
152	IL-10 мыши	MPGSALLCLLLLTGMRISRGQYSREDNNCTHFPV GQSHMLLELRTAFSQVKTFQTKDQLDNILLTDSL MQDFKGYLGCQALSEMIQFYLVVMPQAEKHGPE IKEHLNSLGEKLTLMRLRRCHRFLPCENKSKAV EQVKSDFNKLQDQGVYKAMNEFDIFINCIEAYMMI KMKS
153	IL-20 человека	MKASSLAFSLLSAAFYLLWTPSTGLKTLNLGSCVI ATNLQEIRNGFSEIRGSVQAKDGNIDIRILRRTESLQ DTKPANRCCLRHLRLYLDRVFKNYQTPDHHTL RKISSLANSFLTIKKDLRLCHAHMTCHCGEEAMKK YSQILSHFEKLEPQAAVVKALGELDILLQWMEETE
154	IL-20 мыши	MKGFGLAFLFSAVGFLLWTPLTGLKTLHLGSCVI TANLQAIQKEFSEIRDSVQAEDTNIDIRILRTTESLK DIKSLDRCCFLRHLVRFYLDREVFKVYQTPDHHTL KISSLANSFLIHKDLSVCHSHMACHCGEEAMEKY NQILSHFIELELQAAVVKALGELGILLRWMEEML
155	IL-14 человека	MKNQDKKNGAAKQSNPKSSPGQPEAGPEGAQERP SQAAPAVEAEGPGSSQAPRKPEGAQARTAQSGAL RDVSEELSRQLEDILSTYCVDNNQGGPGEDGAQGE PAEPEDAESRTYVARNGEPEPTPVVNGEKEPSKG DPNTEEIRQSDEVDGRDHRRPQEKKKAKGLGKEIT LLMQTLNLTSTPEEKLAALCKKYAELLEHRNSQK QMKLLQKKQSQLVQEKDHLRGEHSAVLARSKL ESLCRELQRHNRSLKEEGVQRAREEEEEKRKEVTSH FQVTLNDIQLQMEQHNERNSKLRQENMELAERLK KLIEQYELREEHIDKVFHKHDLQQQLVDAKLQQA QEMLKEAEERHQREKDFLLKEAVESQRMCELMK QQETHLKQQLALYTEKFEEFQNTLSKSSEVFTTFK QEMEKMTKKIKKLEKETTMYRSRWESSNKALLE MAEEKTVRDKELEGLQVKIQRLEKLCRALQTERN

		DLNKRVDLSAGGQGLTDSGPERRPEGPGAQAP SSPRVTEAPCYPGAPSTEASGQTGPQEPTSARA
156	IL-14 мыши	MKNQDKKNGPAKHSNSKGSPGQREAGPEGAHGR PRQTAPGAEAEGSTSQAPGKTEGARAKAAQPGAL CDVSEELSRQLEDILSTYCVDNNQGGPAEEGAQGE PTEPEDTEKSRTYAARNGEPEPGIPVVNGEKETSK GEPGTEEIRASDEVGDRDHRRPQEKKKAKGLGKEI TLLMQTLNLTSTPEEKLAALCKKYAELLEHRNSQ KQMKLLQKKQSQLVQEKDHLRGEHSAVLARSK LES LCRELQRHNRS LKEEGVQRAREEEEEKRKEVTS HFQVTLNDIQLQMEQHNERNSKLRQENMELAEERL KKLIEQYELREEHIDKVFHKHDLQQQLVDAKLQQ AQEMLKEAEERHQREKEFLLKEAVESQRMCELMK QQETHLKQQLALYTEKFEEFQNTLSKSSEVFTTFK QEMEKMTKKIKKLEKETTMYRSRWESSNKALLE MAEEKTVRDKELEGLQVKIQRLEKLCRALQTERN DLNKRVDL TAGGITDIGSERRPEATTASKEQGVE SPGAQPASSPRATDAPCCSGAPSTGTAGQTGPGEPT PATA
157	IL-16 человека	MESH SRAGKSRKSAKFRSISRSLMLCNAKTSDDGS SPDEKYPDPFEISLAQGKEGIFHSSVQLADTSEAGP SSVPDLALASEAAQLQAAGNDRGKTCRRIFFMKES STASSREKPGKLEAQSSNFLFPKACHQRARSNSTS VNPYCTREIDFPMTKKSAAPTDRQPYSLCSNRKSL SQQLDCPAGKAAGTSRPTSLSTAQLVQPSGGLQA SVISNIVLMKGQAKGLGFSIVGGKDSIYGPIGIYVK TIFAGGAAAADGRLQEGDEILELNGESMAGLTHQ DALQKFKQAKKGLLTLTVRTRLTAPPSLCSHLSPP LCRSLSSSTCITKDSSSFALESAPSAPISTAKPNYRIM VEVSLQKEAGVGLGIGLCSVPYFQCISGIFVHTLSP GSVAHLDGRLRCGDEIVEISDSPVHCLTLNEVYTL SHCDPGVPPIIVSRHPDPQVSEQQLKEAVAQAVEN TKFGKERHQWSLEGVKRLESSWHGRPTLEKEREK NSAPPHRAQKVMIRSSSDSSYMSGSPGGSPGSGS

		<p>AEKPSSDVIDISTHSPSLPLAREPVVLSIASSRLPQES  PPLPESRDSHPPLRLKKSFEIVRKPMSSKPKPPPRKY  FKSDSDPQKSLEERENSSCSSGHTPPTCGQEARELL  PLLLPQEDTAGRSPSASAGCPGPGIGPQTKSSTEGE  PGWRRASPVTQTSPIKHPLLKRQARMDYSFDTTAE  DPWVRISDCIKNLFSPIMSENHGHMPLQPNASLNE  EEGTQGHDPGTPPKLDTANGTPKVYKSADSSTVK  KGPPVAPKPAWFRQSLKGLRNRASDPRGLPDPALS  TQPAPASREHLGSHIRASSSSSSIRQRISSEFETFGSSQ  LPDKGAQRLSLQPSSGEAAKPLGKHEEGRFSGLLG  RGAAPTLVPQQPEQVLSSGSPAASEARDPGVSESP  PGRQPNQKTLPPGPDLLRLLSTQAEESQGPVLKM  PSQRARSFPLTRSQCETKLLDEKTSKLYSISQVSS  AVMKSLCLPSSISCAQTPCIPKEGASPTSSSNEDSA  ANGSAETSALDTGFSLNLSELREYTEGLTEAKEDD  DGDHSSLQSGQSVISLLSSEELKKLIEEVKVLDEAT  LKQLDGIHVITILHKEEGAGLGFSLAGGADLENKVI  TVHRVFPNGLASQEGTIQKGNEVLSINGKSLKGT  HHDALAILRQAREPRQAVIVTRKLTPEAMPDLNSS  TDSAASASAASDVSVESTAEATVCTVTLEKMSAG  LGFSLEGGKGS LHGDKPLTINRIFKGAASEQSETVQ  PGDEILQLGGTAMQGLTRFEAWNIIKALPDGPVTI  VIRKSLQSKETTAAGDS</p>
158	IL-16 мыши	<p>MEPHGHSKGSRKSTKFRSISRSLILCNAKTSDDGSS  PDEKYDPDFETSLCQGKEGFFHSSMQLADTFEAGL  SNIPDLALASDSAQLAAAGSDRGKHCRKMFFMKE  SSSTSSKEKSGKPEAQSSSFLFPKACHQRTRSNSTS  VNPYSAGEIDFPMTKKSAAPTDRQPYSLCSNRKSL  SQQLDYPI LGTARPTRSLSTAQLGQLSGGLQASVIS  NIVLMKGQAKGLGFSIVGGKDSIYGPIGIYVKSIFA  GGAAAADGRLQEGDEILELNGESMAGLTHQDALQ  KFKQAKKGLLTLTVRTRLTPPSLCSHLSPLCRSL  SSSTCGAQDSSPFSLESPASPASTAKPNYRIMVEVS  LKKEAGVGLGIGLCSIPYFQCISGIFVHTLSPGSVAH</p>

		<p>LDGRLRCGDEIVEINDSPVHCLTLNEVYTILSHCDP  GPVPIIVSRHPDPQVSEQQLEAVAQAVEGVKFGK  DRHQWSLEGVVKRLESSWHGRPTLEKEREKHSAPP  HRRQAQKIMVRSSSDSSYMSGSPGGSPCSAGAEPQP  SEREGSTHSPSLSPGEEQPCPGVPSRPQQESPPLPE  SLERESHPLRLKKSFEILVRKPTSSKPKPPPRKYFK  NDSEPQKKLEEKEKVTDPGHTLPTCSQETRELLPL  LLQEDTAGRAPCTAACCPGPAASTQTSSSTEGESR  RSASPETPASP GKHP LLKRQARMDYSFDITAE DPW  VRISDCIKNLFSPIMSENHSHTPLQPNTSLGEEDGT  QGCPEGGLSKMDAANGAPRVYKSADGSTVKKGP  PVAPKPAWFRQSLKGLRNRAPDPRRPPEVASAIQP  TPVSRDPPGPQPQASSSIRQRISSEFENFGSSQLPDRG  VQRLSLQPSSGETTKFPGKQDGGFRSGLLGQGATV  TAKHRQTEVESMSTTFPNSSEVRDPGLPESPPPGQR  PSTKALSPDPLLRLTTQSEDTQGPGLKMPSQRAR  SFPLTRTQSCETKLLDEKASKLYSISSQLSSAVMKS  LLCLPSSVSCGQITCIPKERVSPKSPCNNSSAAEGFG  EAMASDTGFSNLSELREYSEGLTEPGETEDRNHC  SSQAGQSVISLLSAEELEKLIIEVRVLDEATLKQLD  SIHVTILHKEEGAGLGFSLAGGADLENKVITVHRV  FPNGLASQEGTIQKGNEVLSINGKSLKGATHNDAL  AILRQARDPRQAVIVTRRTTVEATHDLNSSTDSAA  SASAASDISVESKEATVCTVTLEKTSAGLGFSLGEGG  KGS LHGD KPL TINRIFKGTEQGEMVQPGDEILQLA  GTAVQGLTRFEAWNVIKALPDGPVTIVIRRTSLQC  KQTTASADS</p>
159	IL-17 человека	<p>MTPGKTSLSVLLLLLSLEAIVKAGITIPRNP GCPNSE  DKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDY YNRST  SPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGN  VDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVS  VGCTCVTPIVHVA</p>
160	IL-17 мыши	<p>MSPGRASSVSLMLLLLLSLAATVKAAAI PQSSACP  NTEAKDFLQNVKVNKVFNSLGAKVSSRRPSDYL</p>

		NRSTSPWTLHRNEDPDRYPSVIWEAQCRHQRCVN AEGKLDHHMNSVLIQQEILVLKREPESCPFTFRVE KMLVGVGCTCVASIVRQAA
161	CD154 человека	MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQM IGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQR CNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKK ENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAE KGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV TFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTH SSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQV SHGTGFTSFGLLKL
162	CD154 мыши	MIETYSQSPRSVATGLPASMKIFMYLLTVFLITQM IGSVLFAVYLHRRLDKVEEEVNLHEDFVFIKKLKR CNKGEGSLSLLNCEEMRRQFEDLVKDITLNKEEKK ENSFEMQRGDEDPQIAAHVVSEANSNAASVLQWA KKGYYTMKSNLVMLENGKQLTVKREGLYYVYTQ VTFCNREPSSQRPFIVGLWLKPSSGSERILLKAAN THSSSQLCEQQSVHLGGVFELQAGASVFNVTTEAS QVIHRVGFSSFGLLKL
163	LT-бета человека	MGALGLEGRGGRLQGRGSLLLAVAGATSLVTLLL AVPITVLAVLALVPQDQGGLVTETADPGAQAQQG LGFQKLPEEEPETDLSPGLPAAHLIGAPLKGQGLG WETTKEQAFLTSGTQFSDAEGALPQDGLYYLYC LVGYRGRAPPGGGDPQGRSVTLRSSLYRAGGAYG PGTPELLLEGAETVTPVLDPARRQGYGPLWYTSVG FGGLVQLRRGERVYVNISHPDMVDFARGKTFFGA VMVG
164	LT-бета мыши	MGTRGLQGLGGRPQGRGCLLLAVAGATSLVTLLL AVPITVLAVLALVPQDQGRRVEKIIGSGAQAQKRL DDSKPSCILPSPSSLSETPDPRHPQRSNASRNLAST SQGPVAQSSREASAWMTILSPAADSTPDPGVQQLP KGEPETDLNPELPA AHLIGAWMSGQGLSWEASQE EAFLRSGAQFSPHGLALPQDGVYYLYCHVGYRG RTPPAGRSRARSITLRSALYRAGGAYGRGSPELLL

		EGAETVTPVVDPIGYGSLWYTSVGFGLAQLRSGE RVYVNISHPDMVDYRRGKTFFGAVMVG
165	TNF-альфа человека	STESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFS FLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLISLISPLA QAVRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRR ANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKG QGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQ RETPEGAEAKPWYEPIYLGGFQLEKGDRLSAEIN RPDYLDFAESGQVYFGIIL
166	TNF-альфа мыши	NHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNLVVP ADGLYLVSQVLFKGGQCPDYVLLTHTVSRFAISY QEKVNLLSAVKSPCKDTPEGAEAKPWYEPIYLG VFQLEKGDQLSAEVNLPKYLDFAESGQVYFGVIAL
167	TNF-бета человека	MTPPERLFLPRVC GTTLHLLLGLLLVLLPGAQGL PGVGLTPSAAQTARQHPKMHLAHSTLKPAHLIG DPSKQNSLLWRANTDRAFLQDGFSLSNNSLLVPTS GIYFVYSQVVFSGKAYSPKATSSPLYLAHEVQLFSS QYPFHVPLLSSQKMVYPGLQEPWLHSMYHGAAFQ LTQGDQLSTHTDGIPHLVLS PSTVFFGAFAL
168	4-1BBL человека	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAG LLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPR LREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSRSE
169	4-1BBL мыши	MDQHTLDVEDTADARHPAGTSCPSDAALLRDTGL LADAALLSDTVRPTNAALPTDAAYPAVNVRDREA AWPPALNFCSRHPKLYGLVALVLLLLIAACVPIFTR TEPRPALTITSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNT TQQGSPVFAKLLAKNQASLCNTTLNWHWSQDGAGS SYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSP FTNTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVE

		LFPCSMENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVGLRAY LHGAQDAYRDWELSYPNNTTSFGLFLVKPDNPWE
170	APRIL человека	AVLTQKQKKQHSVLHLVPINATSKDDSDVTEVM WQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVL FQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHPD RAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPH GTFLGFVKL
171	APRIL мышцы	MPASSPGHMGGSVREPALSVALWLSWGAVLGAV TCAVALLIQQTE LQSLRREVSRLQRSGGPSQKQGE RPWQSLWEQSPDVLEAWKDGAKSRRRRAVLTQK HKKKHSVLHLVPVNITSKADSDVTEVMWQPVLRR GRGLEAQGDIVRVWDTGIYLLYSQVLFHDVTFTM GQVVSREGQGRRETLFR CIRSMPSDPDRAYNSCYS AGVFHLHQGDITVKIPRANA KLSLSPHGTFLGFVK L
172	CD70 человека	MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLV VCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQ DPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDK GQLRIHRDGIY MVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSIS LLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLPP SRNTDETFFGVQWVRP
173	CD70 мышцы	MPEEGRPCPWVRWSGTA FQRQWPWLLL VVFITVF CCWFHCSGLLSKQQQR LLEHPEPHTAELQLNLTVP RKDPTLRWGAGPALGRSFTHGPELEEGHLRIHQDG LYRLHIQVTLANCSSPGSTLQHRATLAVGICSPAA HGISLLRGRFGQDCTVALQRLTYLVHGDVLCNLT LPLLPSRNADETFFGVQWICP
174	CD153 человека	MDPGLQQALNGMAPPGDTAMHVPAGSVASHLGT TSRSYFYLTATLALCLVFTVATIMVLVVQRTDSIP NSPDNVPLKGGNCSEDLLCILKRAPFKKSWAYLQ VAKHLNKT KLSWNKDGILHG VRYQDGNLVIQFPG LYFIICQLQFLVQCPNNSVDLKLELLINKHIKKQAL VTVCESGMQTKHVYQNL SQFLLDYLQVNTTISVN VDTFQYIDTSTFPLENVLSIFLYSNSD

175	CD153 мыши	MEPGLQQAGSCGAPSPDPAMQVQPGSVASPWRST RPWRSTSRSYFYLSTTALVCLVVAVAIILVLVVQK KDSTPNTTEKAPLKGGNCSEDLFCTLKSTPSKKS W AYLQVSKHLNNTKLSWNEDGTIHGLIYQDGNLIV QFPGLYFIVCQLQFLVQCSNHSVDLTLQLLINSKIK KQTLVTVCESGVQSKNIYQNLSQLLLHYLQVNSTI SVRVDNFQYVDTNTFPLDNVLSVFLYSSSD
176	CD178 человека	MQQPFNYPPYQIYWVDSSASSPWAPPGTVLPCPTS VPRRPGQRRPPPPPPPPPLPPPPPPPLPPLPLPPLKK RGNHSTGLCLLVMFFMVLVALVGLGLGMFQLFHL QKELAELESTSQMHTASSLEKQIGHPSPPPEKKEL RKVAHLTGKSNRSRSMPLWEDTYGIVLLSGVKYK KGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNNLPLSHKV YMRNSKYPQDLVMMEGKMMSYCTTGQMWARSS YLGAVFNLTADHLYVNVSELSLVNFEESQTFEGL YKL
177	CD178 мыши	MQQPMNYPCPQIFWVDSSATSSWAPPGSVFPCPSC GPRGPDQRRPPPPPPPVSPPLPPSQPLPLPPLTPLKK KDHNTNLWLPVFFMVLVALVGMGLGMYQLFHL QKELAELEFTNQSLKVSSFEKQIANPSTPSEKKEP RSVAHLTGPNHSRSIPLEWEDTYGTALISGVKYYK GGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNNQPLNHKVY MRNSKYPEDLVMEEKRLNYCTTGQIWAHSSYLG AVFNLTADHLYVNISQLSLINFEESKTFFGLYKL
178	GITRL человека	MTLHPSPITCEFLFSTALISPKMCLSHLENMPLSHSR TQGAQRSSWKLWLFCSIVMLLFLCSFSWLIFIFLQL ETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDW KLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYK NKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNS EHQVLKNNTYWGILLANPQFIS
179	GITRL мыши	MEEMPLRESSPQRAERCKKSWLLCIVALLMLLCS LGTLIYTSKPTAIESCMVKFELSSSKWHMTSPKPH CVNTTSDGKLIKILQSGTYLIYGQVIPVDKKYIKDN APFVVQIYKKNVDVLQTLMNDFQILPIGGVYELHAG

		DNIYLFNSKDHQKTNTYWGIIIMPDLPFIS
180	LIGHT человека	MEESVVRPSVVFVVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCSV ARVGLGLLLLLMGAGLAVQGWFLQLHWRLGEM VTRLPDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AHLTGANS SLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTK AGYYYIYSKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVV HLEAGEKVVVRVLDERLVRLRDGTRS YFGAFMV
181	LIGHT мыши	MESVVQPSVVFVVDGQTDIPFRRLEQNHRRRRCGT VQVSLALVLLGAGLATQGWFLRLRHQLGDIVA HLPDGGKGSWEKLIQDQRSHQANPA AHLTGANAS LIGIGGPLLWETRLGLAFLRGLTYHDGALVTMEPG YYYVYSKVQLSGVGCPLGLANGLPITHGLYKRTS RYPKELELLVSRSPCGRANSSRVWWDSSFLGGV VHLEAGEEVVVRVPGNRLVRPRDGTRS YFGAFMV
182	OX40L человека	MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGL GLLLCFTYICLHFSALQVSHRYPRIQSIKVQFTEYK KEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLK GYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVA SLTYKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQN PGEFCVL
183	OX40L мыши	MEGEGVQPLDENLENGSRPRFKWKKTLRLVVSGI KGAGMLLCFIYVCLQLSSSPAKDPPIQRLRGAVTR CEDGQLFISSYKNEYQTMEVQNNSVVIKCDGLYII YLKGSFFQEVKIDLHFREDHNPISIPMLNDGRRIVF TVVASLAFKDKVYLTVNAPDTLCEHLQINDGELIV VQLTPGYCAPEGSYHSTVNQVP
184	TALL-1 человека	MDDSTEREQSRLTSCCLKKREEMKLKECVSILPRKE SPSVRSSKD GKLLAATLLLALLSCCLTVVSYFYQVA ALQGD LASLRAELQGHHA EKLPAGAGAPKAGLEE APAVTAGLKIFEPPAPGEGNSSQNSRNKRAVQGPE ETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRG SALEEKENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGH LIQRKKVHVFGDELSLVTLFRCIQNMPETLPNNSC

		YSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGA LKLL
185	TALL-1 мыши	MAMAFCPKDQYWDSSRKSCVSCALTCSQRSQRTC TDFCKFINCRKEQGRIYDHLGACVSCDSTCTQHP QQCAHFCEKRPRSQANLQPELGRPQAGEVEVRSD NSGRHQGSEHGPGRLSSDQLTLYCTLGVCLCAIF CCFLVALASFLRRRGEPLPSQPAGPRGSQANS PHARHPVTEACDEVTASPQPVETCSFCFPERSSPTQESA PRSLGIHGFAGTAAPQPCMRATVGGGLGVLRASTG DARPAT
186	TRAIL человека	MAMMEVQGGPSLGQTCVLIVIFTVLLQSLCVAVT YVYFTNELKQMMDKYKSGIACFLKEDDSYWDPN DEESMNSPCWQVKWQLRQLVRKMILRTSEETIST VQEKQQNISPLVRERGPQRVAAHITGTRGRSNTLS SPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNG ELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMV QYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSI YQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAF LVG
187	TRAIL мыши	MPSSGALKDLSFSQHFRMMVICIVLLQVLLQAVSV AVTYMYFTNEMKQLQDNYSKIGLACFSKTDEDFW DSTDGEILNRPCLOVKRQLYQLIEEVTLRTFQDTIS TVPEKQLSTPPLPRGGRPQKVAAHITGITRRSNSAL IPISKDGKTLGQKIESWESSRKGHSFLNHVLFNRNGE LVIEQEGLYIYSQTYFRFQEAEDASKMVSKDKVR TKQLVQYIYKYTSYPDPIVLMKSARNSCWSRDAE YGLYSIYQGGIFELKKNDRIFVSVTNEHLMDLDQE ASFFGAFLIN
188	TWEAK человека	MAARRSQRRRGRRGEPGTALLVPLALGLGLALAC LGLLLAVVSLGSRASLSAQEPAQEELVAEEDQDPS ELNPQTEESQDPAPFLNRLVRPRRSAPKGRKTRAR RAIAAHYEVHPRPGQDGAQAGVDGTVSGWEEARI NSSSPLRYNRQIGEFIVTRAGLYLYCQVHFDEGK

		AVYLKLDLLVDGVLALRCLEEFSAATAASSLGPQLR LCQVSGLLALRPGSSLRIRTLPW AHLKAAPFLTYF GLFQVH
189	TWEAK мышцы	MASAWPRSLPQILVLGFGLVLMRAAAGEQAPGTS PCSSGSSWSADLDKCMDCASCPARPHSDFCLGCA AAPPAHFRLWPILGGALSLVLVLALVSSFLVWRR CRRREKFTTPIEETGGEGCPGVALIQ
190	TRANSE человека	MRRASRDYTKYLRGSEEMGGGPGAPHEGPLHAPP PPAPHQPPAASRSMFVALLGLGLGQVVCSVALFFY FRAQMDPNRISEDGTHCIYRILRLHENADFQDTTLE SQDTKLIPDSCRRKQAFQGAVQKELQHIVGSQHIR AEKAMVDGSWLDLAKRSKLEAQPFAHLTINATDI PSGSHKVSLSWYHDRGWAKISNMFTSNGKLIVN QDGFYYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVYVT KTSIKIPSSHTLMKGGSTKYWSGNSEHFHYSINVGG FFKLRSAGEEISIEVSNPSLLDPDQDATYFGAFKVRDI D
191	TRANSE мышцы	MRRASRDYGKYLRSSSEEMGSGPGVPHEGPLHPAP SAPAPAPPPAASRSMFLALLGLGLGQVVCSIALFLY FRAQMDPNRISEDSTHCFYRILRLHENADLQDSTL ESEDTLPDSCRRMKQAFQGAVQKELQHIVGPQRFS GAPAMMEGSWLDVAQRGKPEAQPFAHLTINAASI PSGSHKVTLSWYHDRGWAKISNMTLNGLKLRVN QDGFYYLYANICFRHHETSGSVPTDYLQLMVYVV KTSIKIPSSHNLMKGGSTKNWSGNSEHFHYSINVG GFFKL RAGEEISIQVSNPSLLDPDQDATYFGAFKVQ DID
192	TGF-beta1 человека	MPPSGLRLLLLLLLPLLWLLVLT PGRPAAGLSTCKTI DMELVKRKRIE AIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKE VTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELRE AVPEPVLLSRAELRLRLKLVQHVELYQKYSN NSWRYLSNRL LAPSDSPEWLSFDVTGVVVRQWLSR GGEIEGFRLSAHCSDSRDNTLQVDINGFTTGRRG

		DLATIHGMNRPFLLL MATPLERAQHLQSSRHRRAL DTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYYVGRKPKVEQLSNMI VRSCCKCS
193	TGF-бета 1 мышцы	MPPSGLRLLPLLLPLWLLVLTTPGRPAAGLSTCKTI DMELVKRKRIE AIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKE VTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIRE AVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNN SWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQ GDGIQGFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKRRG DLGTIHDNRPFLLL MATPLERAQHLHSSRHRRAL DTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASASPCCVQALEPLPIVYYYVGRKPKVEQLSNMI VRSCCKCS
194	TGF-бета 2 человека	MHYCVLSAFLILHLVTVALSLSTCSTLDMDQFMR KRIE AIRGQILSKLKL TSPPE DYPEPEE VPPEVISIYN STRDLLQEKASRRAACERERSDEEYYAKEVYKID MPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASN LVKAEFRVFRLQNP KARVPEQRIELYQILKSKDLTS PTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTD AVHEWLHH KDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSEELEARF AGIDGTSTYTS GDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLML LPSYRLESQQTNRKKRALDAAYCFRNVQDNCC RPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYL WSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLT ILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCKCS
195	TGF-бета 2 мышцы	MHYCVLSTFLLLHLVPVALSLSTCSTLDMDQFMR KRIE AIRGQILSKLKL TSPPE DYPEPEDEVPEVISIYN STRDLLQEKASRRAACERERSDEEYYAKEVYKID MPSHLPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSTMEKNASN LVKAEFRVFRLQNP KARVAEQRIELYQILKSKDLT

		SPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDVAVQEWLH HKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEA RFAGIDGTSTYASGDQKTIKSTRKKTSGKTPHLLL MLLPSYRLESQQSSRRKKRALDAAYCFRNVQDNC CLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACP YLWSSDTQHTKVLSTYNTINPEASASPCCVSQDLE PLTILYYIGNTPKIEQLSNMIVKSCKCS
196	TGF-бета 3 человека	MKMHLQRALVVLALLNFATVLSLSLSTCTTLDFGHI KKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVL ALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEI HKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVE KNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQILRP DEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVRE WLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVM EIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLIL MMIPPHRLDNPQGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEEN CCVRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYANFCSGPC PYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVQDL EPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCCKCS
197	TGF-бета 3 мыши	MHLQRALVVLALLNLATISLSLSTCTTLDFGHIKK KRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPSVMTHVPYQVLALY NSTRELLEEMHGEREEGCTQETSESEYYAKEIHKF DMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNG TNLFRAEFRVLRVPNPSSKRTEQRIELFQILRPDEHI AKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLR RESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENVHEVMEIKF KGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMI PPHRLDSPGQGSQRKKRALDTNYCFRNLEENCCV RPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYANFCSGPCPYL RSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVQDLEPL TILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCCKCS
198	EPO человека	MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICD SRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDT KVNFYAWKRMEVGQQAWEVWQGLALLSEAVLR

		GQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLR ALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYS NFLRGKCLKLYTGEACRTGDR
199	ЕРО мыши	MGVPERPTLLLLSLLLPLGLPVLCAPPRLICDSRV LERYILEAKEAENVTMGCAEGPRLSENITVPDTKV NFYAWKRMEVEEQAIQEVWQGLSLLSEAILQAQAL LANSSQPPELQLHIDKAISGLRSLTSLLRVLGAQK ELMSPPDTTPAPLRTLTVDTFCKLFRVYANFLRG KLKLYTGEVCRRGDR
200	ТРО человека	MELTELLLVMLLLTARLTLSSPAPPACDLRVLSK LLRDSHVLHSRLSQCPEVHPLPTVLLPAVDFSLGE WKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGP TCLSSLLGQLSGQVRLLL GALQSLGTQLPPQGRT TAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVR RAPPTTAVPSRTSLVLTNLNPNRTSGLLETNFTAS ARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPG YLNRIHELLNGTRGLFPGPSRRTL GAPDISSGTSDT GSLPPNLQPGYSPSPHPPTGQYTLFPLPPTLPTPVV QLHPLLDPSPAPTPTPSPLLNTSYTHSQNLSQEG
201	ТРО мыши	MELTDLLLAAMLLAVARLTLSSPVAPACDPRLLN KLLRDSHLLHSRLSQCPCDVPDPLSIPVLLPAVDFSLG EWKTQTEQSKAQDILGAVSLLLEGVMAARGQLEP SCLSSLLGQLSGQVRLLL GALQGLGTQLPLQGRT TAHKDPNALFLSLQQLLRGKVRFLLLVEGPTLCVR RTLPTTAVPSSTSQLLTLNKFPNRTSGLLETNFSVT ARTAGPGLLSRLQGFRVKITPGQLNQTSRSPVQISG YLNRTHGPNVNGTHGLFAGTSLQTLASDISPGAFN KGSALFNLQGGLPSPSLAPDGHPTFPSPALPTTH GSPQLHPLFPDPSTTMPNSTAPHPVTMYPHPRNLS QET
202	FLT-3L человека	MTVLAPAWSPTTYLLLLLLLLSSGLSGTQDCSFQHS PISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCG GLWRLVLAQRWMERLKT VAGSKMQGLLERVNTE IHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVA

		LKPWITRQNF SRCLELQCQPDSSTLPPPWSRPLEA TAPTAPQPPLLLLLL PVGLLLAAAWCLHWQRTR RRTPRPGEQVPPVSPQDLLLLVEH
203	FLT-3L мыши	MTVLAPAWSPNSSLLLLLLLLSPCLRGTPDCYFSHS PISSNFKVKFRELTDHLLKDYPVTVAVNLQDEKHC KALWSLFLAQRWIEQLKT VAGSKMQTLLEDVNTE IHFVTSCTFQPLPECLRFVQTNISHLLKDTCTQLLA LKPCIGKACQNF SRCLEVQCQPDSSTLLPPRSPIALE ATELPEPRRQLLLLLLLLLPLTLVLLAAAWGLRW QRARRRGELHPGVPLPSHP
204	SCF человека	MKKTQTWILTCIYLQLLLLFNPLVKTEGICRNRVTN NVKDVTKLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLP SHC WISEMVVQLSDSLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKL VNIVDDLVECVKENS SKDLKKSFKSPEPRLFTPEEF FRIFNRSIDAFKDFVVA SETSDCVVSSTLSPEKDSR VSVTKPFMLPPVAASSLRNDSSSSNRKAKNPPGDS SLHWAAMALPALFSLIIGFAFGALYWKKRQPSLTR AVENIQINEEDNEISMLQEKEREFQEV
205	SCF мыши	MKKTQTWIITCIYLQLLLLFNPLVKTEICGNPVTDN VKDITKLVANLPNDYMITLNYVAGMDVLP SHCWL RDMVIQLSLSLTLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLGKI VDDL VLCMEENAPKNIKESPKRPETRSFTPEEFFSIF NRSIDAFKDFMVASDTSDCVLSSTLGPEKDSRVSV TKPFMLPPVAASSLRNDSSSSNRKAAKAPEDSGLQ WTAMALPALISLVIGFAFGALYWKKKQSSLTRAV ENIQINEEDNEISMLQKQKEREFQEV
206	M-CSF человека	MTAPGAAGRCPPPTTWLGSLLLL VCLLASRSITEEV SEYCSHMIGSGHLQSLQRLIDSQMETSQCITFEFVD QEQLKDPVCYLKKAFLLVQDIMEDTMRFRDNTPN AIAIVQLQELSLRLKSCFTKDYEEHDKACVRTFYE TPLQLLEKVKNVFNETKNLLDKDWNIFSKNCNNSF AECSSQDVVTKPDCNCLYPKAIPSSDPASVSPHQPL APSMAPVAGLTWEDSEGTEGSSLLPGEQPLHTVDP GSAKQRPPRSTCQSFEPETPVVKDSTIGGSPQPRPS

		<p>VGAFNPGMEDILDSAMGTNWVPEEASGEASEIPVP  QGTELSRPGGGSMQTEPARPSNFLSASSPLPASA  KGQQPADVTGTALPRVGPVRPTGQDWNHTPQKT  DHPSALLRDPPEPGSPRISSLRPQGLSNPSTLSAQPO  LSRSHSSGSVLPLGELEGRRSTRDRRSPAEEGGPA  SEGAARPLPRFNSVPLTDTGHERQSEGSFSPQLQES  VFHLLVPSVILVLLAVGGLLFYRWRRRSHQEPQRA  DSPLEQPEGSPLTQDDRQVELPV</p>
207	М-CSF <b>мышь</b>	<p>MTARGAAGRCPSSTWLGSRLLLVCLLMSRSIAKE  VSEHCSTMIGNHGLKVLQQLIDSQMETSCQIAFEF  VDQEQLDDPVCYLKKAFFLVQDIIDETMRFKDNTF  NANATERLQELSNNLNSCFTKDYEEQNKACVRTF  HETPLQLLEKIKNFFNETKNLLEKDOWNIFTKNCNN  SFAKCSSRDVVTKPDCNCLYPKATPSSDPASASPH  QPPAPSMAPLAGLAWDDSQRTGSSLLPSELPLRIE  DPGSAKQRPPRSTCQTLESTEQPNGDRLTEDSQP  HPSAGGPVPGVEDILESSLGTNWVLEEASGEASEG  FLTQEAKFSPSTPVGGSIQAETDRPRALSASPFKST  EDQKPVDITDRPLTEVNPMRPIGQTQNNTPKTDG  TSTLREDHQEPGSPHIATPNPQRVSNSATPVAQLLL  PKSHSWGIVLPLGELEGKRSTRDRRSPAEEGGSA  SEGAARPVARFNSIPLTDTGHVEQHEGSSDPQIPES  VFHLLVPGIILVLLTVGGLLFYKWKWRSHRDPQTL  DSSVGRPEDSSLTQDEDRQVELPV</p>
208	MSP <b>человека</b>	<p>MGWLPLLLLLTQCLGVPGQRSPLNDFQVLRGTEL  QHLLHAVVPGPWQEDVADAEECAGRCGPLMDCR  AFHYNVSSHGCQLLPWTQHSPHTRLRRSGRCDLF  QKKDYVRTCIMNNGVGYRGTMTTVGGLPCQAW  SHKFPNDHKYTPTLRNGLEENFCRNPDPGPGPW  CYTTDPAVRFQSCGIKSCREAACVWCNGEEYRGA  VDRTEGREGQRWDLQHPHQHPFEPGKFLDQGLD  DNYCRNPDGSERPWYTTDPQIEREFCDLPRCGSE  AQRQEATTVSCFRGKGEGYRGTTANTTTAGVPCQ  RWDQAIPHQHRFTPEKYACKDLRENFCRNPDGSE</p>

		<p>APWCFTLRPGMRAAFCYQIRRCTDDVRPQDCYHG  AGEQYRGTVSKTRKGVQCQRWSAETPHKPQFTFT  SEPHAQLEENFCRNPDGDSHGPPWCYTMDPRTPTFD  YCALRRCADDQPPSILDPPDQVQFEKCGKRVDRLD  QRRSKLRVVGHPGNSPWTVSLRNRQGQHFCGGS  LVKEQWILTARQCFSSCHMPLTGYEVLGTLFQN  PQHGEPSLQRVPVAKMVCGPSGSQVLKLLERSVT  LNQRVALICLPPEWYVPPGKCEIAGWGETKGT  GNDTVNLNVALLNVISNQEENIKHRGRVRESEMCTE  GLLAPVGACEGDYGGPLACFTHNCWVLEGIIPNR  VCARSRWPAVFTRVSVFVDWIHKVMRLG</p>
209	MSP <b>мышь</b>	<p>MGLPLPLLQSSLLMLLLRLSAASTNLNWQCPRIP  YAASRDFSVKYVVPFSAGGRVQATAAYEDSTNS  AVFVATRNLHLVLPDLQFIENLTTGPIGNPGCQT  CASCGPDPHGPPKDDTLVLMPEGLPALVSCGST  LQGRCLHELEPRGKALHLAAPACLFSAANNKPEA  CTDCVASPLGTRVTVVEQGHASYFYVASSLDPELA  ASFSPRSVSIRRLKSDTSGFQPGFSLSVLPKYLASY  LIKVVYSFHSGDFVYFLTVQPISVTSPPSALHTRLV  RLNAVEPEIGDYRELVLDCHFAPKRRRRGAPEGTQ  PYPVLQAAHSAPVDAKLAVELISEGQEVLFVGFV  TVKDGSGMGPNSVVCAPFIYHLNIIIEGVEYCC  HSSNSSLLSRGLDFFQTPSFCPNPPGGEASGPSSRC  HYFPLMVHASFTRVDLFDLNGLLGSVKVTALHVTRL  GNVTVAHMGTVDGRVLQVEIARSLNYLLYVSNFS  LGSSGQPVHRDVSRLGNDLLFASGDQVFKVPIQGP  GCRHFLTCWRCLRAQRFMGCGWCGDRCDRQKEC  PGSWQQDHCPPEISEFYPHSGPLRGTTTLTLCGSNF  YLRPDDVPEGTHQITVGQSPCRLPKDSSSPRPGS  LKEFIQELECELEPLVTQAVGTTNISLVITNMPAGK  HFRVEGISVQEGFSFVEPVLTSIKPDFGPRAGGTYL  TLEGQSLVGTSTRVAVLVNGTQCRLEQVNEEQILCV  TPPGAGTARVPLHLQIGGAEVPGSWTFHYKEDPIV  LDISPKCGYSGSHIMIHGQHLTSAWHFTLSFHGQ</p>

		STVESRCAGQFVEQQRRRCRLPEYVVRNPQGWAT GNLSVWGDGAAGFTLPGFRFLPPPSPLRAGLVELK PEEHSVKVEYVGLGAVADCVTVNMTVGGEVCQH ELRGDVVICPLPPSLQLGKDGVPPLQVCVDGGCHIL SQVVRSSPGRASQRILLIALLVILLVAVLAVLALIFN SRRRKQQLGAHSLSPPTLSDINDTASGAPNHEESSE SRDGTSVPLLRTESIRLQDLDRMLLAEVKDVLPHE QVVIHTDQVIGKGHFGVVYHGEYTDGAQNQTHC AIKSLSRITEVQEVEAFLREGLLMRGLHHPNILALI GIMLPPEGLPRVLLPYMRHGDLLHFIRSPQRNPTV KDLVSFGLQVACGMEYLAEQKFVHRDLAARNCM LDESFTVKVADFGGLARGVLDKEYYSVRQHRHARL PVKWMALSLQTYRFTTKSDVWSFGVLLWELLTR GAPPYPHIDPFDLSHFLAQGRRLPQPEYCPDSLYHV MLRCWEADPAARPTFRALVLEVKQVVASLLGDH YVQLTAAAYVNVGPRAVDDGSPPEQVQPSQHCRCR STSKPRPLSEPPLPT
210	Линкер	GSSGSGGSGG
211	Линкер	GGGSGGGS
212	Линкер	GGGSGGGSGGGS
213	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS
214	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
215	Линкер	GGGGSGGGGS
216	Линкер	(GGGGS) <sub>n</sub>
217	Линкер	GGGGSGS
218	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGS
219	Линкер	GGSLDPKGGGGS
220	Линкер	PKSCDKTHTCPPCPAPELLG
221	Линкер	SKYGPPCPPCPAPEFLG
222	Линкер	GKSSGSGSESKS
223	Линкер	GSTSGSGKSSEGKG
224	Линкер	GSTSGSGKSSEGSGSTKG
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
235	Линкер	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
от 236 до 244	(Намеренно опущено)	(Намеренно опущено)
245	Линкер	GPQGTAQ
от 246 до 249	(Намеренно опущено)	(Намеренно опущено)
250	Линкер	YGAGLGW
от 251 до 262	(Намеренно опущено)	(Намеренно опущено)
263	CM	APRSALAHGLF
264	CM	AQNLLGMY
265	CM	LSGRSDNHGGAVGLLAPP
266	CM	VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH
267	CM	LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP
268	CM	LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS
269	CM	ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH
270	CM	LSGRSDNHGGSGGSQLRMA
271	CM	QIQALRMAGGSGGSLSGRSDNH
272	CM	LSGRSGNHGGSGGSQLRMA
273	CM	QIQALRMAGGSGGSLSGRSGNH
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	SSSFDKGKYKKGDDA
285	Расщепляемая последовательность	SSSFDKGKYKRGDDA
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	YGAGLGVV

	последовательность	
296	Расщепляемая последовательность	AGLGVVER
297	Расщепляемая последовательность	AGLGISST
298	Расщепляемая последовательность	EPQALAMS
299	Расщепляемая последовательность	QALAMSAI
300	Расщепляемая последовательность	AAYHLVSQ
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- $\alpha$ 2b-1204dL-hIgG4	METDTLLLWVLLWVPGSTGCDLPQTHSLGSRRT LMLLAQMRRISLFCLKDRHDFGFPQEFGNQFQK AETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFY TELYQQLNDEACVIQGVGVTEETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLST NLQESLRSKESGRSDNIGGGSESKYGPPCPPCPAPE

		<p>FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE  DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV  VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS  KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG  FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL  YSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK  SLSLS</p>
310	<p>IFN-<math>\alpha</math>-1204dL-hIgG4  (полинуклеотид)</p>	<p>ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTG  CTTTTGTGGGTGCCAGGATCCACAGGCTGTGATC  TGCTCAAACGCATTCATTGGGGTCCAGGCGCA  CGCTTATGTTGCTTGCACAGATGAGGAGAATAT  CACTTTTCTCTTGCTTGAAGGACCGCCACGATTT  TGGCTTTCCGCAGGAAGAGTTCGGTAACCAAGTT  CCAAAAGGCAGAGACAATCCCCGTTTTGCATGA  GATGATCCAACAGATCTTTAACCTGTTTTCAACC  AAGGATAGCAGCGCAGCGTGGGATGAGACACTG  CTTGACAAGTTTTACACCGAGCTCTATCAGCAAC  TTAATGATCTCGAAGCCTGCGTAATTCAAGGAG  TAGGCGTTACAGAGACACCTTTGATGAAGGAGG  ATCCATCCTTGCAGTAAGAAAATACTTCCAGA  GGATCACCTCTACCTCAAAGAAAAGAAATACT  CCCCATGCGCGTGGGAAGTAGTGCGAGCTGAAA  TAATGCGGAGCTTTTCTTTGTCAACTAATCTCCA  AGAATCTCTGAGAAGCAAGGAGTCAGGTAGGTC  TGATAATATCGGGGGAGGTTCTGAATCTAAGTA  CGGCCCTCCTTGTCTCCATGTCCTGCTCCAGAG  TTTCTCGGAGGCCCTCCGTGTTCTGTTTCTCC  AAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAAC  CCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGACGTTTCA  CAAGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTAC  GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC  AAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTAC  AGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG  GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAG</p>

		<p>GTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAG  AAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAG  GGAACCCAGGTTTACACACTGCCACCTAGCCA  AGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC  CTGCCTGGTCAAGGGCTTTTACCCCTCCGATATC  GCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAG  AACAACTACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGAC  AGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAGACTG  ACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAA  CGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCT  GCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCT  GAGCTGA</p>
311	IFN- $\alpha$ 2b-1490DNI- hIgG4	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGCDLPQTHSLGSRRT  LMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQK  AETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFY  TELYQQLNDLEACVIQGVGVVTETPLMKEDSILAVR  KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLST  NLQESLRSKEISSGLLSGRSDNIGGGSESKYPPCPP  CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI  EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC  LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG  SFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHY  TQKLSLS</p>
312	IFN- $\alpha$ 2b-1490DNI- hIgG4 (полинуклеотид)	<p>ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTG  CTTTTGTGGGTGCCAGGATCCACAGGCTGTGATC  TGCTCAAACGCATTCATTGGGGTCCAGGCGCA  CGCTTATGTTGCTTGCACAGATGAGGAGAATAT  CACTTTTCTCTTGCTTGAAGGACCGCCACGATTT  TGGCTTTCCGCAGGAAGAGTTCGGTAACAGTT  CCAAAAGGCAGAGACAATCCCCGTTTTGCATGA  GATGATCCAACAGATCTTTAACCTGTTTTCAACC  AAGGATAGCAGCGCAGCGTGGGATGAGACTG</p>

		<p>CTTGACAAGTTTTACACCGAGCTCTATCAGCAAC  TTAATGATCTCGAAGCCTGCGTAATTCAAGGAG  TAGGCGTTACAGAGACACCTTTGATGAAGGAGG  ATTCCATCCTTGCAGTAAGAAAATACTTCCAGA  GGATCACCTCTACCTCAAAGAAAAGAAATACT  CCCCATGCGCGTGGGAAGTAGTGCGAGCTGAAA  TAATGCGGAGCTTTTCTTTGTCAACTAATCTCCA  AGAATCTCTGAGAAGCAAGGAGATTAGTTCTGG  CCTGCTGTCAGGTAGGTCTGATAATATCGGGGG  AGGTTCTGAATCTAAGTACGGCCCTCCTTGTCT  CCATGTCCTGCTCCAGAGTTTCTCGGAGGCCCT  CCGTGTTCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACAC  CCTGATGATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTG  CGTGGTGGTCGACGTTTCACAAGAGGACCCCGA  GGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA  AGTGCAACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGG  AACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCG  TGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACG  GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGG  GCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCA  AGGCCAAGGGCCAGCCAAGGGAACCCAGGTTT  ACACACTGCCACCTAGCCAAGAGGAAATGACCA  AGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGG  GCTTTTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGA  GAGCAATGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGAC  CACACCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTC  TTCCTGTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGC  AGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGC  GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC  CAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCTGA</p>
313	ProC440 без сигнальной последовательности	<p>CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHD  FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLSTKD  SSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV  TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW</p>

		<p>EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGRSDNICPPCP  APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDV  SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY  RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV  KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF  FLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT  QKSLSLS</p>
314	<p>Первый мономер  PROC657 (мутация по  типу «выступ») без  сигнальной  последовательности</p>	<p>CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHD  FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD  SSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV  TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW  EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGRSDNICPPCP  APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDV  SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY  RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  TISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCL  VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS  FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT  QKSLSLSLG</p>
315	<p>Fc IgG человека с  мутацией по типу  «выступ»</p>	<p>CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCV  VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP  SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSL  WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH  NHYTQKSLSLSLG</p>
316	<p>Fc IgG человека с  мутацией по типу  «впадина»</p>	<p>CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCV  VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP  SSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSL  SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  DGSFFLVSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN  RFTQKSLSLSLG</p>

317	фрагмент в виде «заглушки»	SDNI
318	Линкер	GSSGGS
319	Линкер	ESKY
320	ProC286 без сигнальной последовательности	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSSGGGGSGRSDNIGGGSC DLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDS SAAWDETLDDKFTELYQQLNDLEACVIQGVGVT ETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWE VVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
321	Линкер	SGGG
322	Второй мономер PROС657 (мутация по типу «впадина») без сигнальной последовательности	SDNICPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLSDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNRFTQKSLSLSLG
323	Последовательность PRO859 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFTTKD SSAAWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERV GETPLMNVDSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAW EVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKELSGRSDNICPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL

		LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLS
324	Универсальная последовательность IFN-альфа A/D	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFTTKD SSAAWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERV GETPLMNVDSILAVKKYFRITLYLTEKKYSPCAW EVRRAEIMRSLSLSTNLQERLRKE
325	Бета-интерферон, А- цепь, человеческий (1AU1)	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKD RMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIF RQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEK LEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYS H CAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNR
326	IFNB_CHICK Q90873.1	MTANHQSPGMHSILLLLLLPAITTTFSCNHLRHQD ANFSWKSLLQNTAPPPPQPCPQDVTFFPETL LKSDDKKQAAITTLRILQHLFNMLSSPHTPKHWID RTRHSLLNQIQHYIHHLEQCFVNQGTRSQRGPRN AHLKINKYFRSIHNFQHNNSACTWDHVRQLQAR DCFRHVDTLIQWMKSRAPLTASSKRLNTQ
327	IFNA3_CANLF O97945.1	MALPCSFSVALVLLSCHSLCCLACHLPDTHSLRNW RVLTLGQMRRLSASSCDHYTTDFAFPKEKFDGQR LQEAQALSVVHVMTQKVFHLFCTNTSSAPWNMTL LEELCSGLSEQLDDLDACPLQEAGLAETPLMHEDS T LRTYFQRISLYLQDRNHSPCAWEMVRAEIGRSFFS LTILQERVRRRK
328	IFN_ANAPL P51526.1	MPGPSAPPPPAIYSALALLLLLTPPANAFSCSPLRLH DSAFAWDSLQLLRNMAPSPTQPCPQQHAPCSFP DTLLDTNDTQQAHTALHLLQHLFDLSSPSTPAH WLHTARHDLLNQLQHIIHHLERCFPADAARLHRR G PRNLHLSINKYFGCIQHFLQNHTYSPCAWDHVRLE

		AHACFQRIHRLTRTMR
329	IFNAH_BOVIN P49878.1	MAPAWSFLLALLLLSCNAICSLGCHLPHTHSLPNR RVLTLRQLRRVSPSSCLQDRNDFAFPQEALGGSQ LQKAQAISVLHEVTQHTFQLFSTEGSAAAWDESL DKLRAALDQQLTDLQACLRQEEGLRGAPLLKEDA S LAVRKYFHRLTLYLREKRHNPCAWEVVRAEVMR AFSSSTNLQERFRRKD
330	IFNA1_CHICK P42165.1	MAVPASPQHPRGYGILLTLLKALATTASACNHL RPQDATFSHDSLQLLRDMAPTLPLCPQHNASCSF NDTILDTSNTRQADKTTHDILQHLFKILSSPSTPAH WNDSQRQSLNRIHRYTQHLEQCLDSSDTRSRT WPRNLHLTIKKHFSLHTFLQDNDYSACAWEHVR LQARAWFLHIHNLGNTRT
331	IFNA_FELCA P35849.1	MALPSSFLVALVALGCNSVCSLGCDDLQTHGLLNR RALTLGQMRRLPASSCQKDRNDFAFPQDVFGGD Q SHKAQALSVVHVVTNQKIFHFFCTEASSSAAWNTTL LEEFCTGLDRQLTRLEACVLQEVEEGEAPLTNEDI HPEDSILRNYFQRLSLYLQEKKYSPCAWEIVRAEI MRSLYYSSTALQKRLRSEK
332	интерферон-бета-1 [Sus scrofa] AAA31056.1	MANKCILQIALLMCFSTTALSMSYDVLRYQQRSSN LACQKLLGQLPGTPQYCLEDRMNFEVPEEIMQPPQ FQKEDAVLIHEMLQQIFGILRRNFSSTGWNETVIK TILVELDGQMDDLETILEEIMEEENFPRGDMTIL HLKKYYLSILQYLKSKEYRSCAWTVVQVEILRNFS FLNRLTDYLRN
333	IFNB2_BOVIN P01576.1	MTHRCLLQMVLLLCFSTTALSRSYLLRFQQRSL ALCQKLLRQLPSTPQHCLREARMDFQMPEEMKQAQ Q FQKEDAILVIYEMLQQIFNILTRDFSSTGWSETIIE LLEELYEQMNHLEPIQKEIMQKQNSTMGDTTVL HLRKYYFNLVQYLKSKEYNRCAWTVVRVQILRN SFLTRLTGYLRE

334	А-цепь, ИНТЕРФЕРОН- АЛЬФА 2В 1RH2	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTK DSSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVG VTETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCA W EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
335	Линкер	SGGGG
336	ProC288 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVG TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE <u>SGGGGSGRSD</u> <u>NICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</u> CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLS
337	ProC289 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVG TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE <u>SGGGGSGRSD</u> <u>NIGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP</u> EVTVCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLS
338	ProC290 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVG

		TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGGGGSGRSD NIES <u>SKYGP</u> <u>PPC</u> <u>PPC</u> PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLS
339	ProC291 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGGGGSGRSD NIGGGSESKYGP <u>PPC</u> <u>PPC</u> PAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
340	ProC441 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGRSDNIGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
341	ProC442 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGRSDNIESKY GPPC <u>PPC</u> <u>PPC</u> PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV

		TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLS
342	ProC443 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMMLLAQMRRISLFSCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKD SSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVRRAEIMRSFSLSTNLQESLSKESGRSDNIGGGS ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLS
343	Сигнальная последовательность	MRAWIFFLLCLAGRALA
344	Сигнальная последовательность	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG
345	Сигнальная последовательность	METDTLLLWVLLLWVPGSTG
346	(Намеренно опущено)	(опущено)
347	IL-15 человека (аминокислоты 49– 161)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLIILAN NSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINT
348	IL-15 человека (аминокислоты 49– 162)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLIILAN NSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTS

349	CM	LSGRSNI
350	ProC1471 IL- 15(NT)_1204DNI <sub>dL</sub> _Ig G4(C226), с сигнальной последовательностью	<i>METDTLLLWVLLLWVPGSTGNWVN</i> VISDLKKIEDLI QSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVIS LESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGRSDNICPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDS FFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLS
351	ProC1874	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILAN NSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTS LSGRSDNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLS

352	ProC1875	<p>NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC  KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLIILAN  NSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIV  QMFINTS  GLSGRSDNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI  SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN  AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE  EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFS  SVMHEALHNHYTQKSLSLS</p>
353	ProC1876	<p>NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC  KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLIILAN  NSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIV  QMFINTS  GGLSGRSDNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL  MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH  NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ  EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  NYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFS  CSVMHEALHNHYTQKSLSLS</p>
354	ProC1877	<p>NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC  KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLIILAN  NSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIV  QMFINTS  LSGRSDNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR  TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK  TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFS  SVMHEALHNHYTQKSLSLS</p>

355	ProC1878	<p>NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC  KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLIILAN  NSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIV  QMFINTS  GLSGRSNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS  RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA  KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  KVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE  MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCS  VMHEALHNHYTQKSLSLS</p>
356	ProC1879	<p>NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC  KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLIILAN  NSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIV  QMFINTS  GGLSGRSNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI  SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN  AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  CKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE  EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSC  SVMHEALHNHYTQKSLSLS</p>
357	IL- 15(NT)_1204DNIdL_Ig G4(C226) (полинуклеотид)	<p>atggaaccgacacactgctgctgtgggtgctgcttttggggtgccaggatcc  acaggcaactgggtaacgtcatatctgacctgaaaaaattgaagacctgatcc  aatcaatgcatattgatgcgactcttatactgaaagtacgttcatccctcatgta  aagttaccgcaatgaaatgttccttcttgaactccaggtgatccctggaatca  ggagacgcaagcatacatgacactgtcgaaaacctgattatcctcgctaataata  gtttgagttctaaccgcaatgttacagagagtgggtgtaaggagtgcgaggagc  tggaggagaagaacatcaaggagttttgcaagcctttgttcacattgtccaaatg  ttatcaaacctcaggtaggtctgataatatctgtcctccatgtcctgctccagag  ttctcggaggccccctcgtgttcctgtttcctcaaagcctaaggacacctgat  gatcagcagaacctgaagtacctgcgtgggtgacgtttcacaagagg  accccagggtgcagttcaattgttacgtggacggcgtggaagtgcacaacgcc  aagaccaagcctagagaggaacagttcaacagcacctacagagtggtgtccgt</p>

		gctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgaag gtgtccaacaagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatcagcaaggcca agggccagccaaggggaaccccaggtttacacactgccacctagccaagagga aatgaccaagaaccagggtgtccctgacctgcctggtaagggtttaccctc cgatatgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaag accacacctctgtgtggacagcgacggctcattcttctgtacagcagactg accgtggacaagagcagatggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtga tgacgagggccctgcacaaccactacaccagaagtctctgagcctgagctga
358	Связывающий IL-15 белок	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQ VHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPD SQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFEN LRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERH LEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLT PDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPA ALGKDT
359	Связывающий IL-15 белок	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRK AGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVH QRPAPP
360	Связывающий IL-15 белок	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRK AGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDP
361	Связывающий IL-15 белок	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRK AGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR
362	Связывающий IL-15 белок	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRK AGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVH QRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSN NTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHG TPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTT
363	Связывающий IL-15 белок	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRK AGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVH QRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAAS

364	Связывающий IL-15 белок	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPP MSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSS LTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAP PSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTT AKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVL LCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDEDLENC SHHL
365	Связывающий IL-2 или IL-15 белок	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQ VHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPE SQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFEN LRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERH LEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLT PDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPA ALGKDT
366	Связывающий IL-2 или IL-15 белок	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQ VHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPD HQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFE NLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFER HLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETL TPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKP AALGKDT
367	Связывающий IL-2 или IL-15 белок	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQ VHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPD SQKLTTQDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFEN LRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERH LEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLT PDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPA ALGKDT
368	Связывающий IL-2 или IL-15 белок	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQ VHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPD SQKLTTFDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFEN LRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERH

		LEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLT PDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPA ALGKDT
369	Связывающий IL-2 или IL-15 белок	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQ VHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPD SQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFEN LRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFQRH LEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLT PDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPA ALGKDT
370	Связывающий IL-2 или IL-15 белок	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQ VHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPD SQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFEN LRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFQRR LEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLT PDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPA ALGKDT
371	Связывающий IL-2 или IL-15 белок	AVNGTSQFTCFYNSYANISCVWSQD GALQDTSCQ VHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPD SQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFEN LRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERH LEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLT PDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPA ALGKDT
372	Связывающий IL-2 или IL-15 белок	LNTTILTPNGNEDTTADFFLTMTPTDSL SVSTLPLP EVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLT LHYWYK NSDNDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHL YQT FVVQLQDPREPRRQATQMLKLQNLVIPWAPENLT LHKLSQSLELNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWD HSWTEQSVDIRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSR FN PLCGSAQHWSEWSPIHWGSNTSKENPFLFALEA

373	Связывающий IL-2 или IL-15 белок	CPDLVCYTDYLTQTVICILEMWNLHPSTLTLTWQD QYEELKDEATSCSLHRSAHNATHATYTCHMDVFH FMADDIFSVNITDQSGNYSQECGSFLLAESIKPAPP FNVTVTFSGQYNISWRSDYEDPAFYMLKGKQLQYE LQYRNRGDPWAVSPRRKLISVDSRSVSLLEFRK DSSYELQVRAGPMPGSSYQGTWSEWSDPVIFQTQS EELKE
374	Связывающий IL-15 белок	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRK AGTSSLTECVLNKATNVANHWTPSLKCIRDPALVH QRPAPPS
375	Спейсер	QGQSGS
376	Спейсер	GQSGS
377	Спейсер	QSGS
378	Спейсер	QGQSGQG
379	Спейсер	GQSGQG
380	Спейсер	QSGQG
381	Спейсер	SGQG
382	Спейсер	QGQSGQ
383	Спейсер	GQSGQ
384	Спейсер	QSGQ
385	Спейсер	QGQSG
386	Спейсер	QGQS
387	Спейсер	EPKSCDKTHT
388	Спейсер	ELKTPLGDTTHT
389	Спейсер	ESKYGPP

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, используемый в АСС по изобретению, может быть любым из тех, которые перечислены в SEQ ID NO: 111–140, 143–146, 151–160 и 347–348, и их варианты. 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.

#### **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 находятся в рамках объема следующей формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС – англ.: activatable cytokine construct), содержащая первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, в которой:
  - (a) первая мономерная конструкция содержит первый полипептид интерлейкина, первый расщепляемый фрагмент (СМ1) и первый домен димеризации (DD1);
  - (b) вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид интерлейкина, второй расщепляемый фрагмент (СМ2) и второй домен димеризации (DD2);
  - (c) первая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий в направлении от N-конца к С-концу полипептид интерлейкина, СМ1 и DD1, дополнительно при этом:
    - (i) каждая из первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции содержит связывающую область, содержащую не более 18 аминокислот, и
    - (ii) полипептид интерлейкина представляет собой IL-15;
  - (d) дополнительно при этом:
    - (i) вторая мономерная конструкция является такой же, как первая мономерная конструкция, и
    - (ii) DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc человеческого IgG;
  - (e) DD1 и DD2 ковалентно связаны друг с другом через по меньшей мере одну дисульфидную связь, образуя тем самым димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и
  - (f) АСС характеризуется сниженным уровнем активности IL-15 по сравнению с рекомбинантным человеческим IL-15, которая измеряется по уровню продукции SEAP (секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы) в чувствительных к IL-2/IL-15 клетках НЕК293.
2. АСС по п. 1, в которой полипептид интерлейкина содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 347.
3. АСС по п. 1, в которой каждый из СМ1 и СМ2 содержит не более 8 аминокислот.
4. АСС по п. 1, в которой каждый из СМ1 и СМ2 независимо расщепляется урокиназой (uPa) и/или матриксной металлопротеиназой (ММР).
5. АСС по п. 1, в которой каждый из СМ1 и СМ2 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 349.
6. АСС по п. 1, в которой каждый из СМ1 и СМ2 содержит последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 100, и SEQ ID NO: 349.

7. ACC по п. 1, в которой DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc человеческого IgG4.
8. ACC по п. 1, в которой DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc IgG1 или IgG4 человека, укороченных на N-конце до цистеина 226 согласно нумерации EU.
9. ACC по п. 7, в которой домены Fc IgG4 человека содержат мутацию S228P согласно нумерации EU.
10. ACC по п. 1, в которой каждый из DD1 и DD2 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 3.
11. ACC по п. 1, в которой каждый из DD1 и DD2 содержит последовательность SEQ ID NO: 3.
12. ACC по п. 1, в которой первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом по меньшей мере двумя дисульфидными связями.
13. ACC по п. 1, в которой первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом по меньшей мере тремя дисульфидными связями.
14. ACC по п. 1, в которой первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом посредством по меньшей мере четырех дисульфидных связей.
15. ACC по п. 1, в которой каждая из первой и второй мономерных конструкций содержит полипептидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотами 21–359 SEQ ID NO: 350.
16. ACC по п. 1, в которой каждая из первой и второй мономерных конструкций содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 350–356.
17. Активируемая цитокиновая конструкция (ACC), содержащая первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, в которой:
  - (a) первая мономерная конструкция содержит первый полипептид интерлейкина, первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1);
  - (b) вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид интерлейкина, второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2);
  - (c) первая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу полипептид интерлейкина, CM1 и DD1, дополнительно при этом:
    - (i) полипептид интерлейкина и CM1 непосредственно примыкают друг к другу,

- (ii) CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу,
  - (iii) полипептид интерлейкина содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 347,
  - (iv) CM1 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID: 349,
  - (d) дополнительно при этом:
    - (i) вторая мономерная конструкция является такой же, как первая мономерная конструкция, и
    - (ii) DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc IgG1 или IgG4 человека;
  - (e) DD1 и DD2 ковалентно связаны друг с другом через по меньшей мере одну дисульфидную связь, образуя тем самым димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и
  - (f) ACC характеризуется сниженным уровнем активности IL-15 по сравнению с активностью рекомбинантного человеческого IL-15.
18. Активируемая цитокиновая конструкция (ACC), которая включает первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, в которой:
- (a) первая мономерная конструкция содержит первый полипептид интерлейкина, первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1),
    - при этом CM1 расположен между полипептидом интерлейкина и DD1; и
  - (b) вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид интерлейкина, второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2),
    - где CM2 расположен между CP2 и DD2; или
- (a) первая мономерная конструкция содержит первый полипептид интерлейкина, первый домен димеризации (DD1) и
  - (b) вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид интерлейкина, расщепляемый фрагмент (CM) и второй домен димеризации (DD2), где CM расположен между CP2 и DD2, при этом CM функционирует в качестве субстрата для протеазы; или
- (a) первая мономерная конструкция содержит первый полипептид интерлейкина, расщепляемый фрагмент (CM) и первый домен димеризации (DD1), где CM расположен между полипептидом интерлейкина и DD1, и
  - (b) вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид интерлейкина и второй домен димеризации (DD2),
    - при этом CM функционирует в качестве субстрата для протеазы; или
- (a) первая мономерная конструкция содержит первый полипептид интерлейкина, и первый домен димеризации (DD1) и

(b) вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид интерлейкина и второй домен димеризации (DD2), при этом первый полипептид интерлейкина, второй полипептид интерлейкина или как первый полипептид интерлейкина, так и второй полипептид интерлейкина включают(-ет) аминокислотную последовательность, которая функционирует в качестве субстрата для протеазы;

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 активности интерлейкина по сравнению с контрольным уровнем активности интерлейкина.

19. АСС по п. 18, в которой DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc.
20. АСС по п. 19, в которой пара доменов Fc представляет собой пару доменов Fc человека.
21. АСС по п. 20, в которой домены Fc человека представляют собой домены Fc IgG1 человека, домены Fc IgG2 человека, домены Fc IgG3 человека или домены Fc IgG4 человека.
22. АСС по п. 21, в которой домены Fc человека представляют собой домены Fc IgG4 человека.
23. АСС по п. 22, в которой домены Fc человека содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 315 или SEQ ID NO: 316.
24. АСС по п. 22, в которой домены Fc человека содержат SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 315 или SEQ ID NO: 316.
25. АСС по п. 18, в которой первый полипептид интерлейкина и/или второй полипептид интерлейкина содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 347.
26. АСС по п. 18, в которой первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция имеют структуру в направлении от N-конца к C-концу первый полипептид интерлейкина -CM1-DD1 и второй полипептид интерлейкина -CM2-DD1, соответственно.
27. АСС по п. 18, в которой первый полипептид интерлейкина и/или второй полипептид интерлейкина содержит последовательность SEQ ID NO: 347.
28. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–27, в которой АСС характеризуется уровнем активности IL-15, сниженным примерно в 100–500 раз по сравнению с рекомбинантным человеческим IL-15, которая измеряется по уровню продукции SEAP (секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы) в

- чувствительных к IL-2/IL-15 клетках НЕК293.
29. АСС по п. 28, в которой АСС характеризуется уровнем активности IL-15, сниженным по меньшей мере в 200 раз по сравнению с рекомбинантным человеческим IL-15.
  30. АСС по п. 28, в которой АСС характеризуется уровнем активности IL-15, сниженным примерно в 250 раз по сравнению с рекомбинантным человеческим IL-15.
  31. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–27, в которой АСС характеризуется тем, что EC50 после расщепления АСС протеазой uPA примерно в 1–10 раз превышает EC50 рекомбинантного IL-15 дикого типа, измеряемую с использованием чувствительных к IL-2/IL15 клеток НЕК293.
  32. АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–27, в которой АСС характеризуется тем, что EC50 после расщепления АСС протеазой uPA примерно в 3–7 раз превышает EC50 рекомбинантного IL-15 дикого типа, измеряемую с использованием чувствительных к IL-2/IL15 клеток НЕК293.
  33. Полинуклеотид, кодирующий полипептид, который содержит CP1 и CM1 АСС по любому из пп. 1–32.
  34. Полинуклеотид по п. 33, в котором полипептид дополнительно содержит DD1 по любому из пп. 1–33.
  35. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 33 или п. 34.
  36. Вектор по п. 35, в котором вектор представляет собой вектор экспрессии.
  37. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 33 или 34 или вектор по п. 35 или п. 36.
  38. Пара нуклеиновых кислот, которые вместе кодируют полипептид, который содержит CP1 и CM1 первой мономерной конструкции, и полипептид, который содержит CP2 и CM2 второй мономерной конструкции, по любому одному или комбинации из пп. 1–32.
  39. Клетка-хозяин, содержащая пару нуклеиновых кислот по п. 38.
  40. Клетка-хозяин по п. 37 или п. 39, в которой клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.
  41. Способ получения АСС, включающий:  
культивирование клетки по любому из пп. 37, 39 или 40 в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для продуцирования АСС; и  
выделение АСС из клетки или жидкой культуральной среды.
  42. Способ по п. 41, дополнительно включающий:

выделение АСС, выделенной из клетки или жидкой культуральной среды.

43. Способ по п. 42, дополнительно включающий:

составление фармацевтической композиции на основе выделенной АСС.

44. АСС, полученная способом по п. 41 или п. 42.

45. Композиция, содержащая АСС по любому из пп. 1–32 или 44.

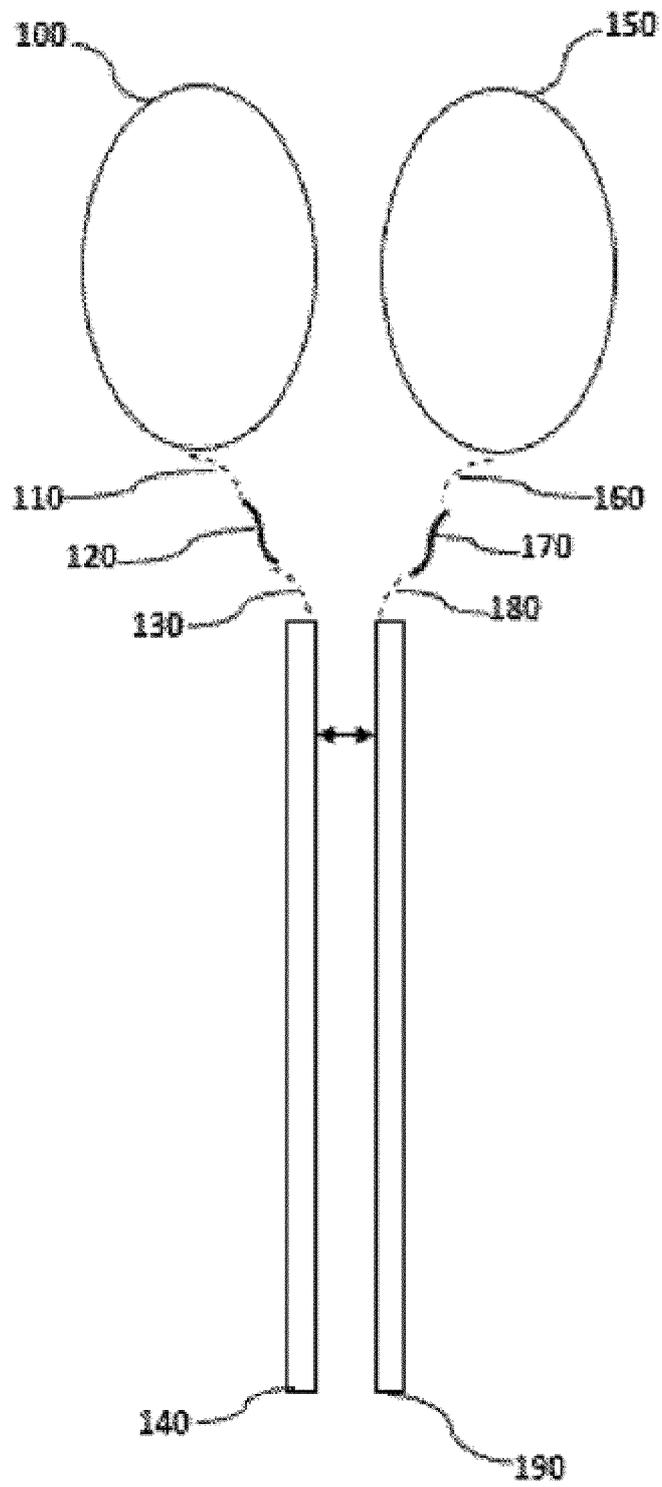
46. Композиция по п. 45, в которой композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

47. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащий по меньшей мере одну дозу композиции по п. 45 или п. 46.

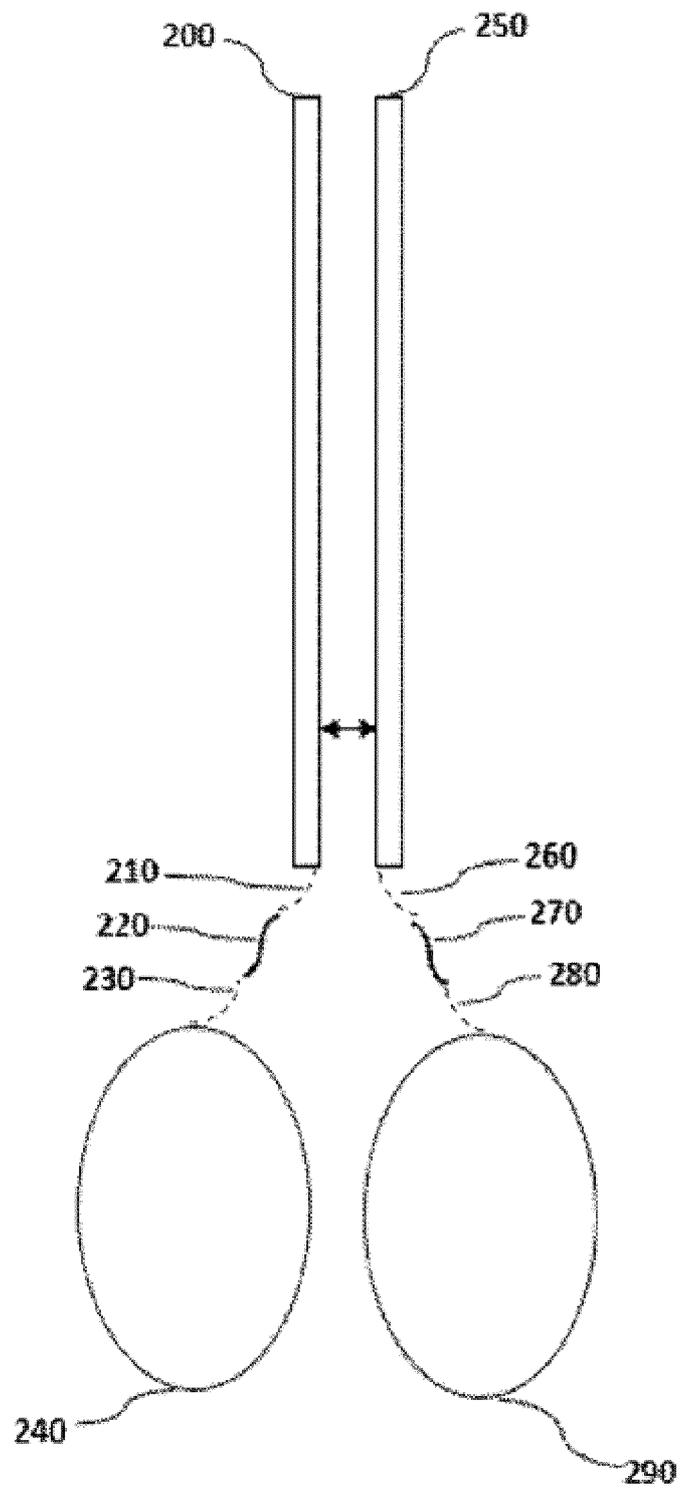
48. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества АСС по любому одному или комбинации из пп. 1–32 или композиции по п. 45 или п. 46.

49. Способ по п. 48, в котором у субъекта идентифицировано или диагностировано злокачественное новообразование.

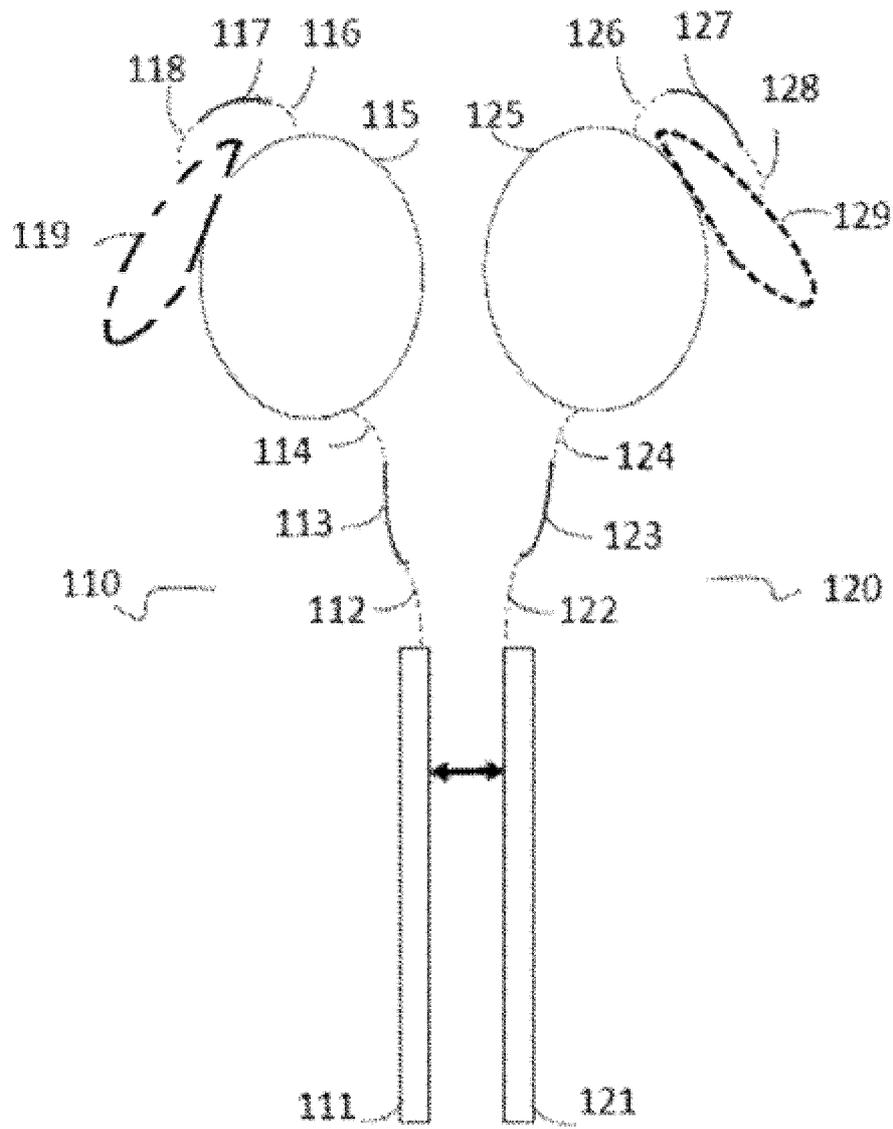
50. Способ по п. 49, в котором злокачественное новообразование представляет собой лейкемию, лимфому или солидную опухоль.



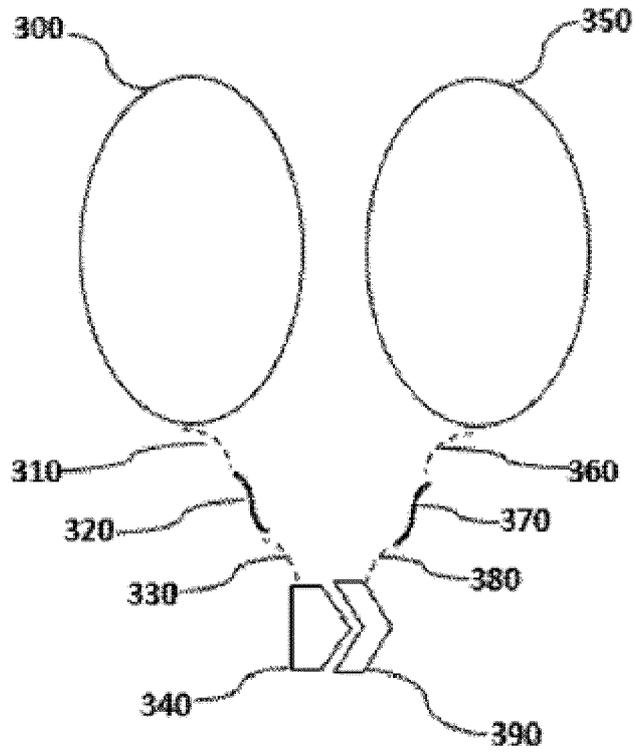
Фиг. 1А



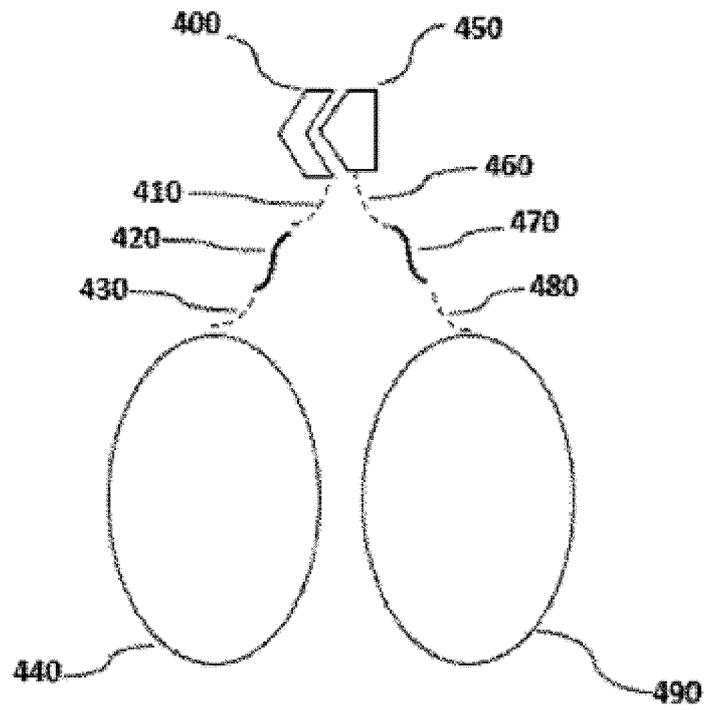
Фиг. 1В



Фиг. 1С



Фиг. 2А



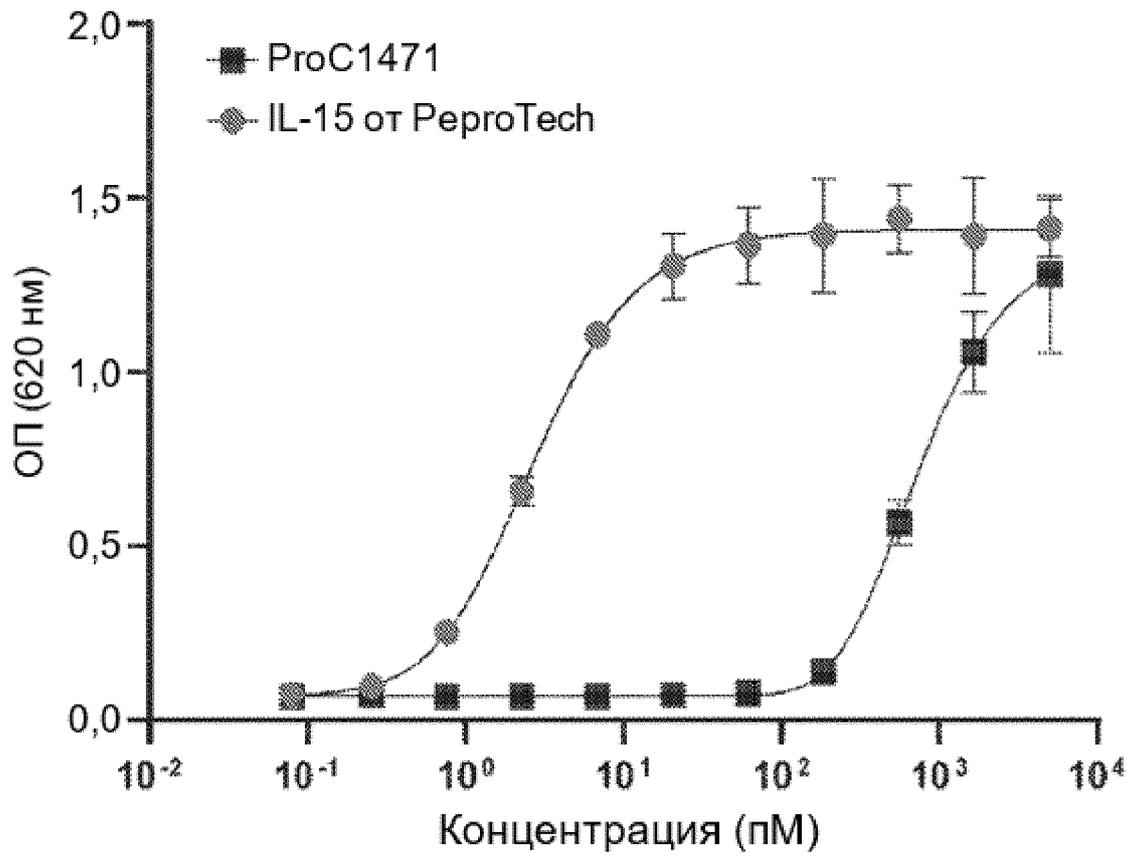
Фиг. 2В

MEIDTLLLWVLLLWVPGSTGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAM  
KCFLLELOVISLESGDASHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLOS  
FVHIVQMFINTSGRSDNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ  
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
S

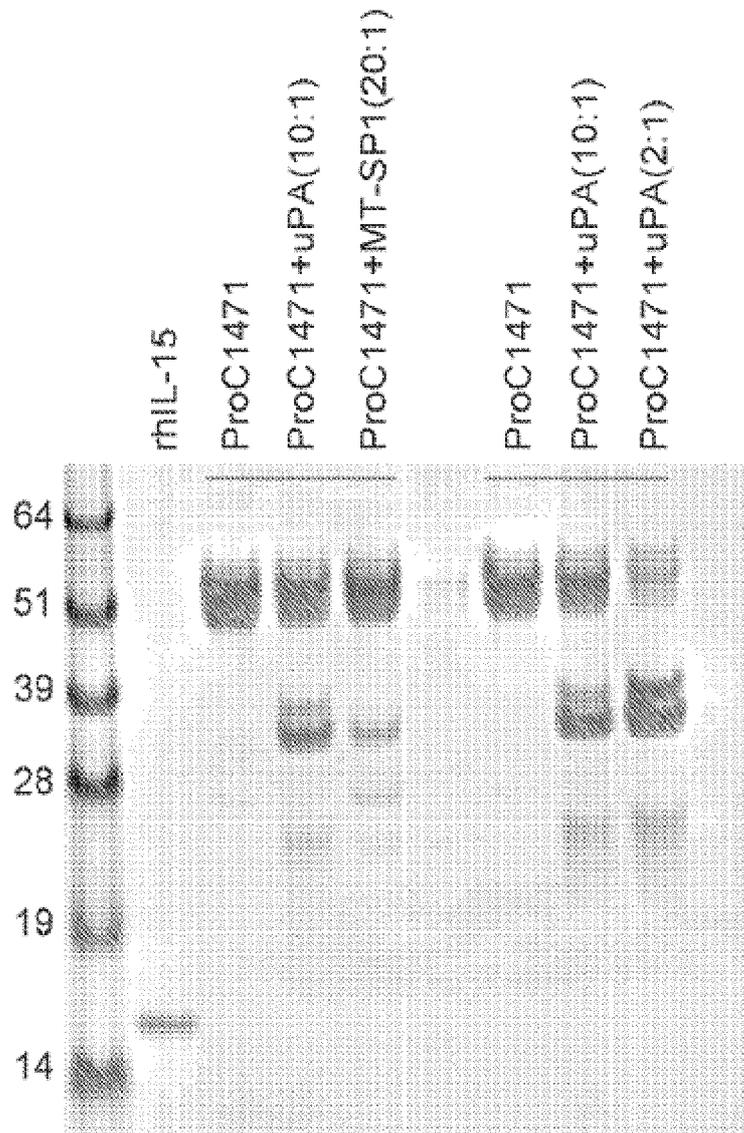
**(SEQ ID NO: 350)**

Фиг. 3

## Репортерный анализ HEK293

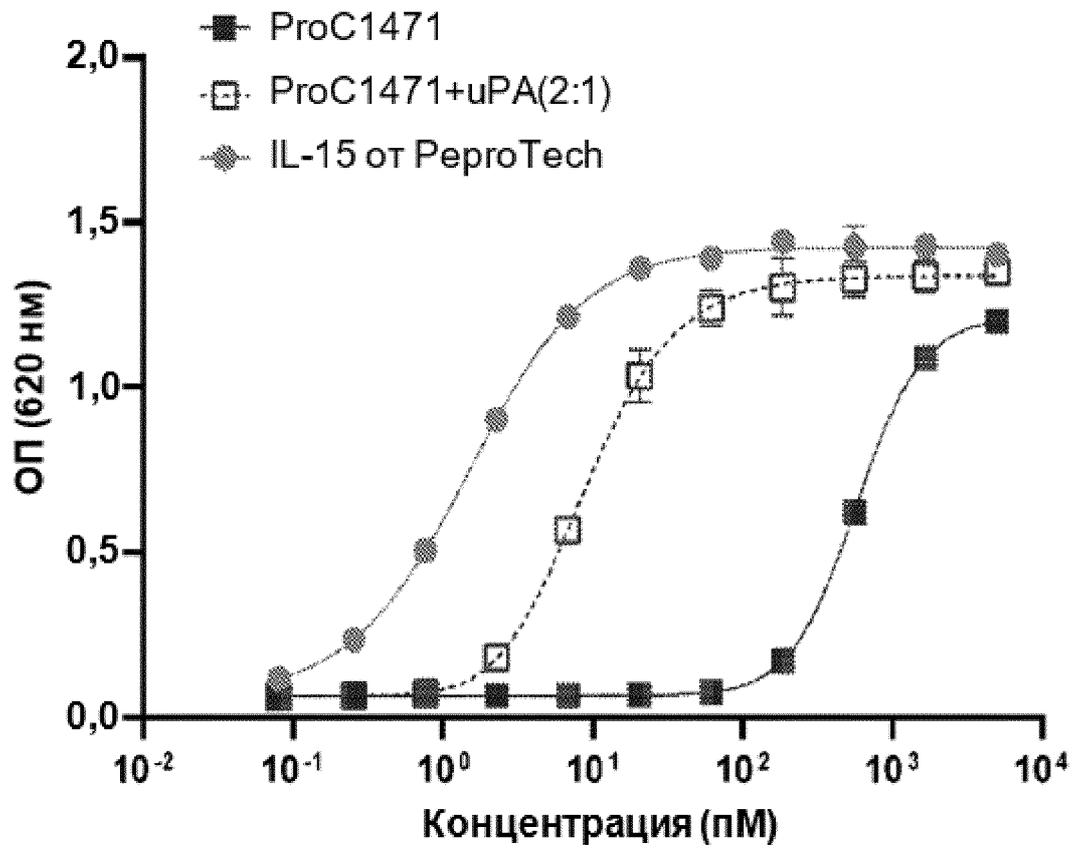


Фиг. 4



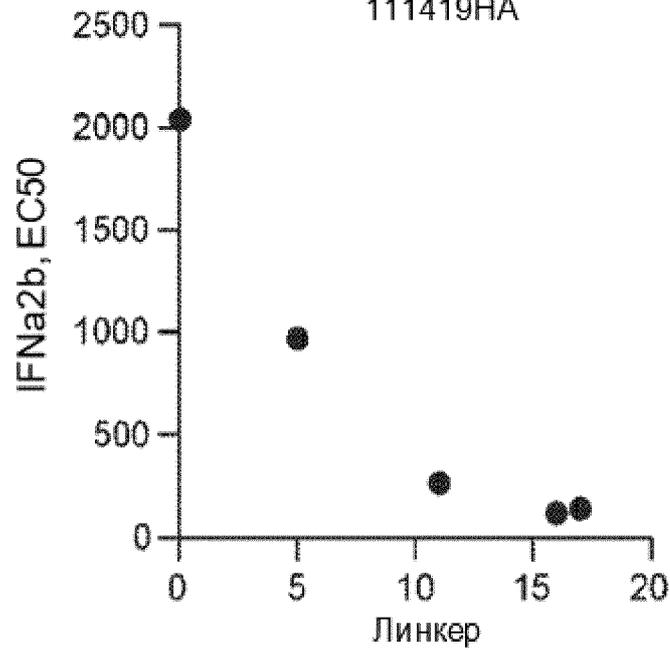
Фиг. 5

## Репортерный анализ НЕК293



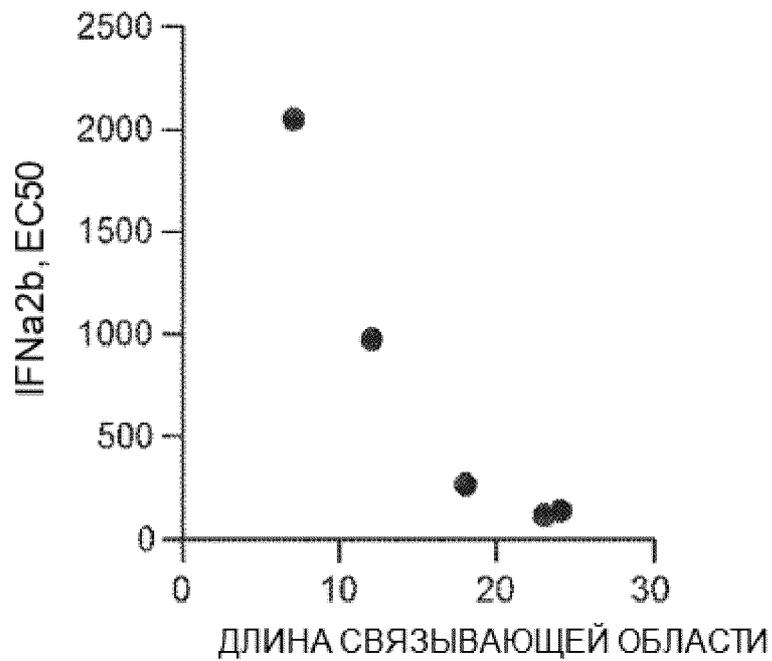
Фиг. 6

EC50: Маскированные  
молекулы IFNa2b, слитые  
на N-конце с hlgG4,  
111419HA



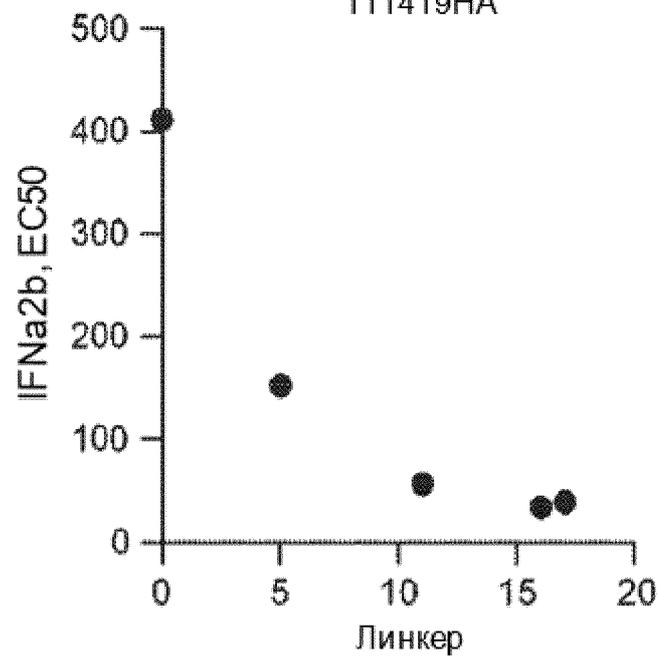
Фиг. 7А

EC50: Маскированные  
молекулы IFNa2b, слитые на  
N-конце с hlgG4, 111419HA



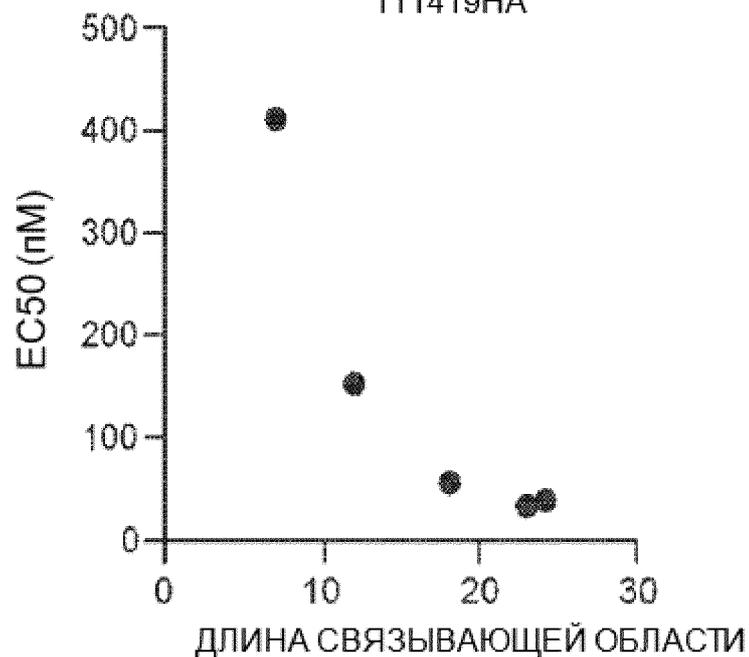
Фиг. 7В

EC50: Маскированные  
молекулы IFN $\alpha$ 2b, слитые  
на N-конце с hlgG4,  
111419HA



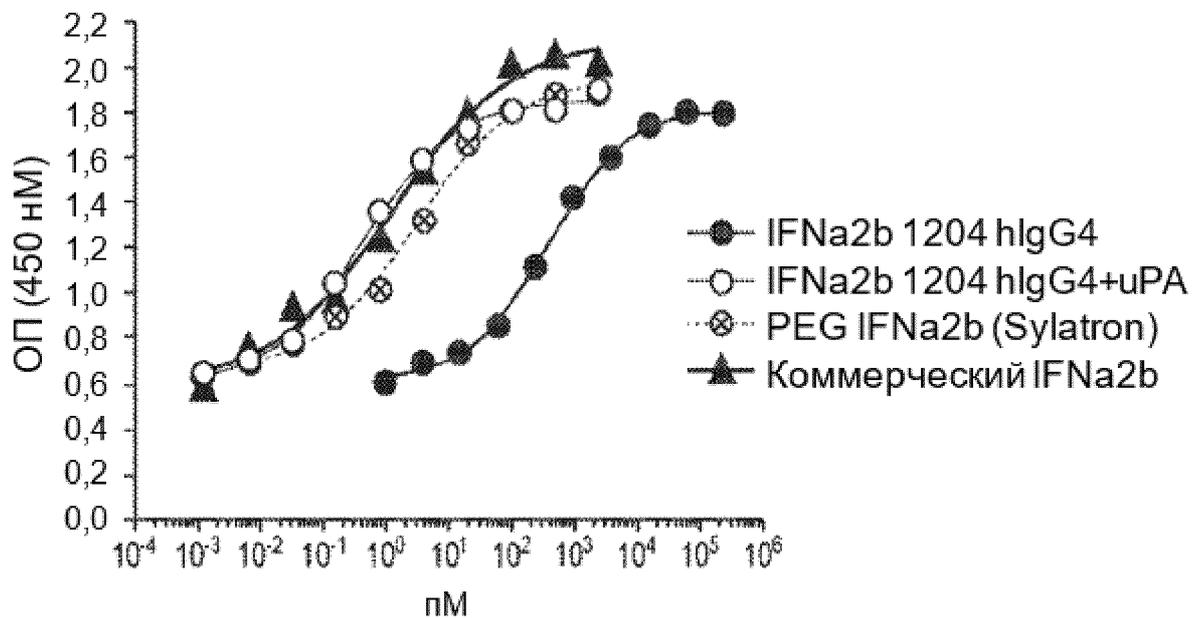
Фиг. 8А

Цитотоксичность в отношении  
Daudi по EC50 слитых  
молекул IFNa2b-hlgG4  
111419HA

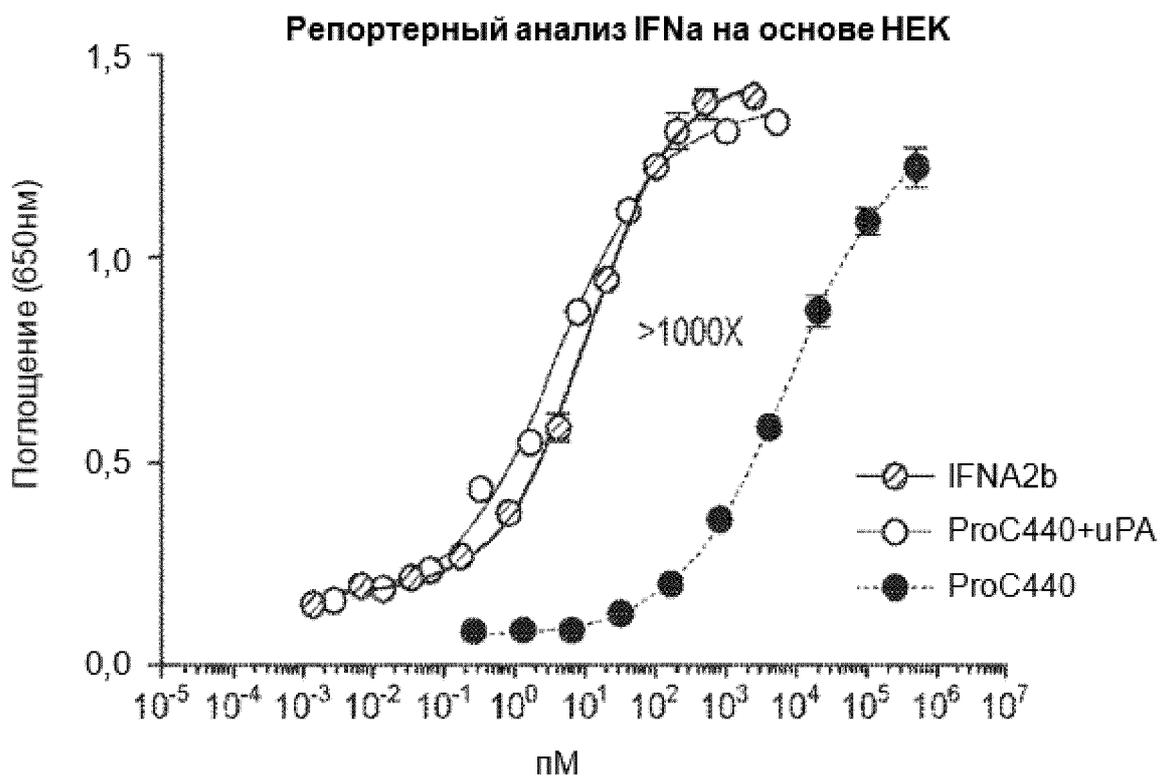
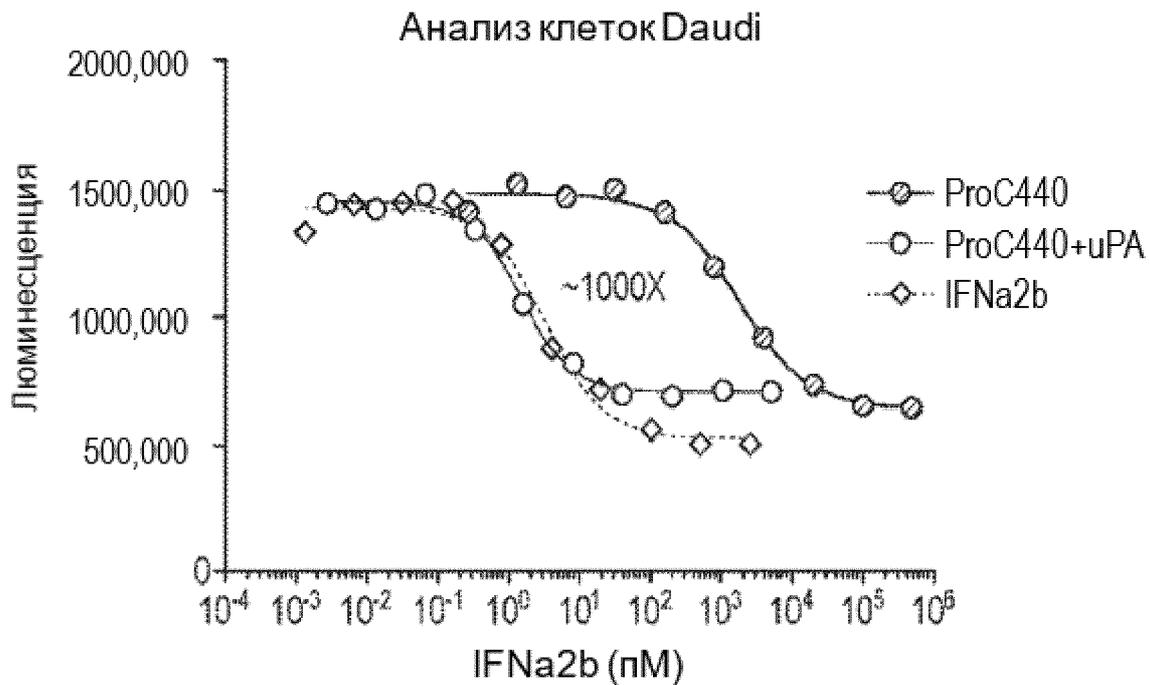


Фиг. 8В

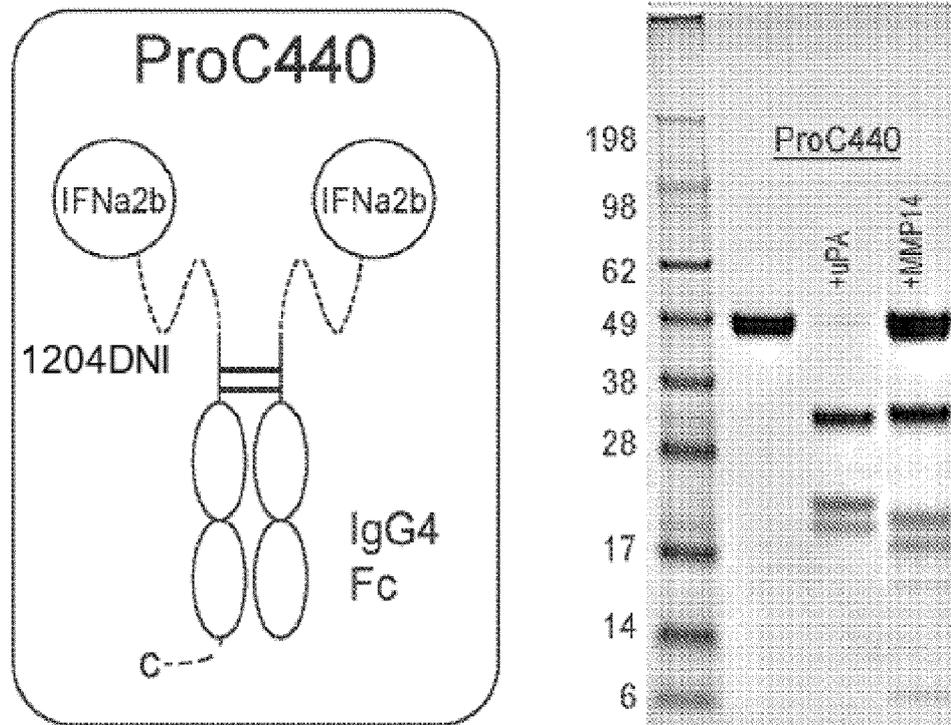
Репортерный анализ IFNa/β на основе HEK293: Активируемый протеазой IFNa2b



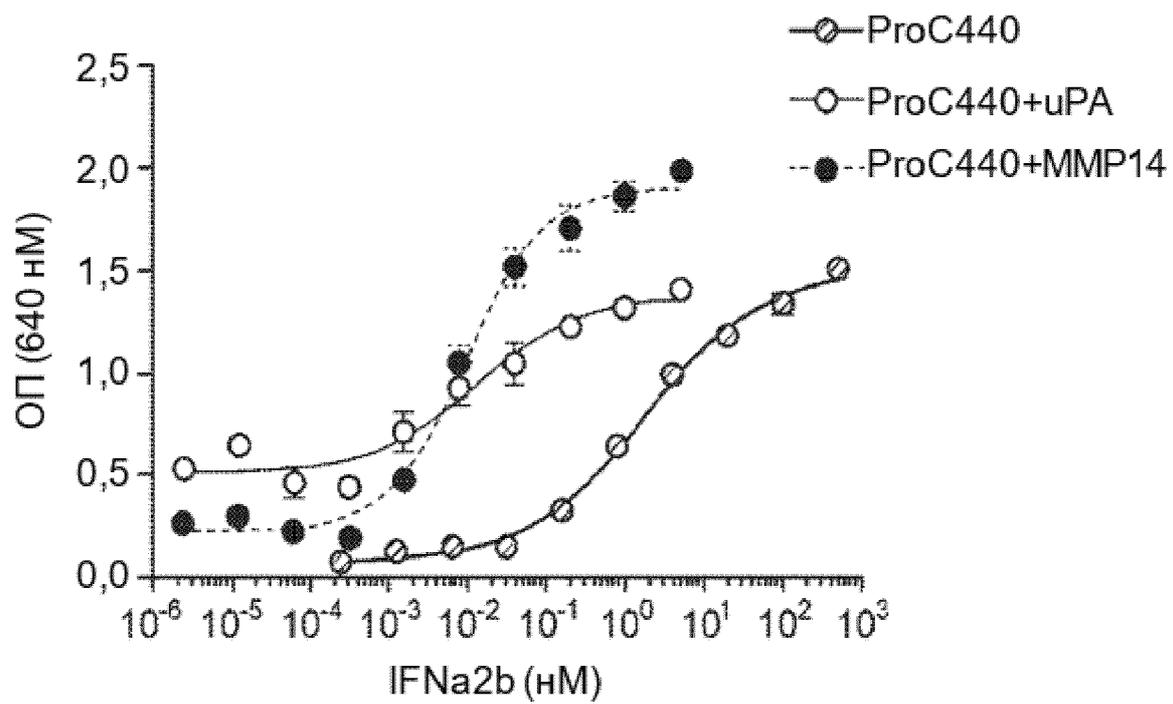
Фиг. 9



Фиг. 10

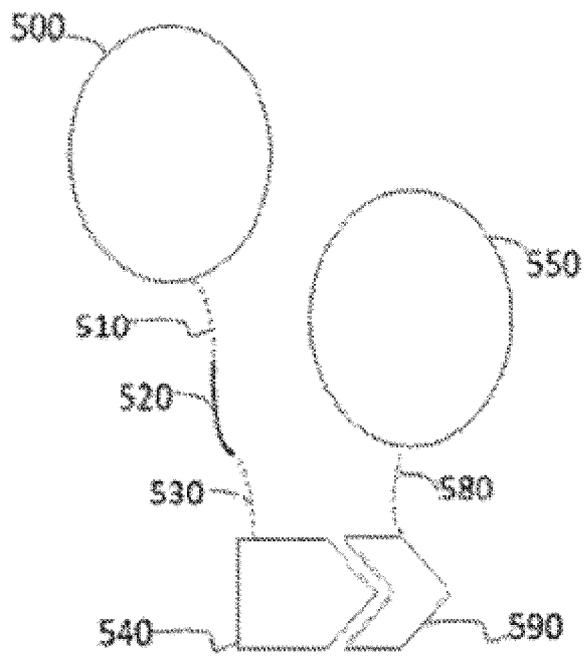


Фиг. 11А

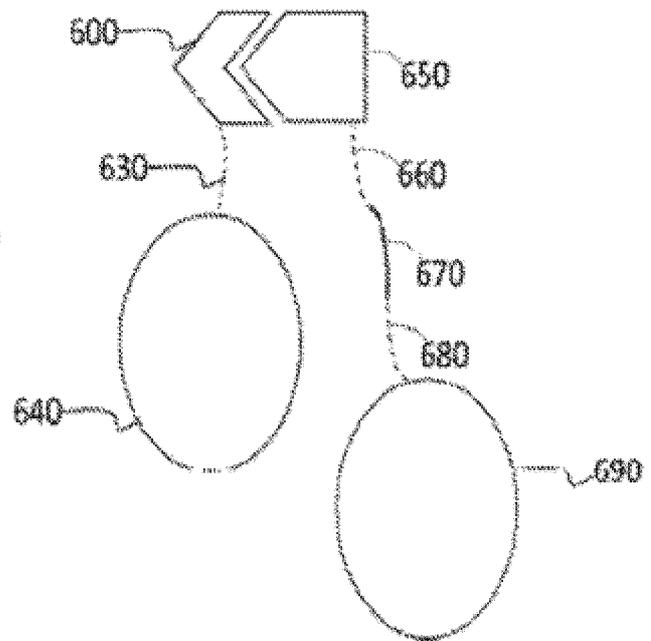


	ProC440	ProC440+uPA	ProC440+MMP14
EC50	1,861	0,01503	0,009833

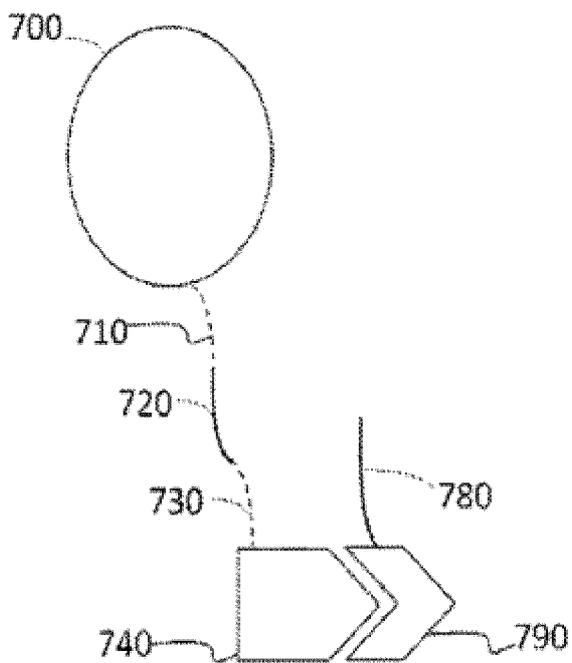
Фиг. 11В



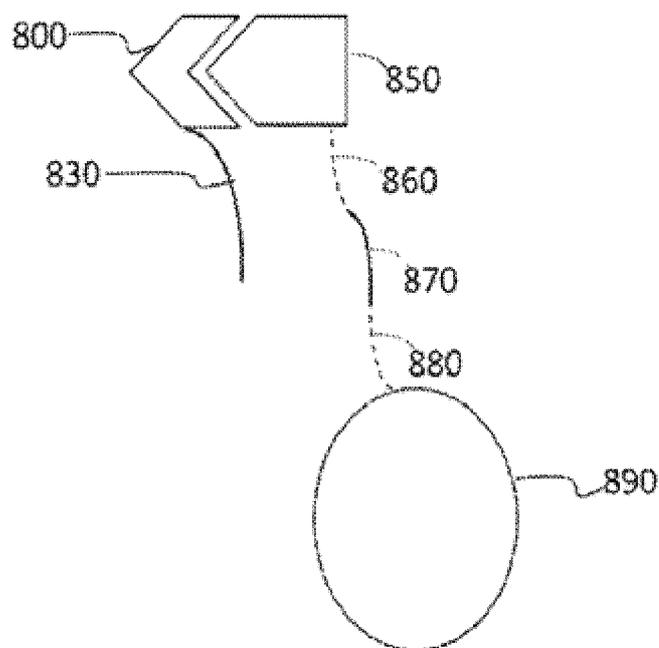
ФИГ. 12А



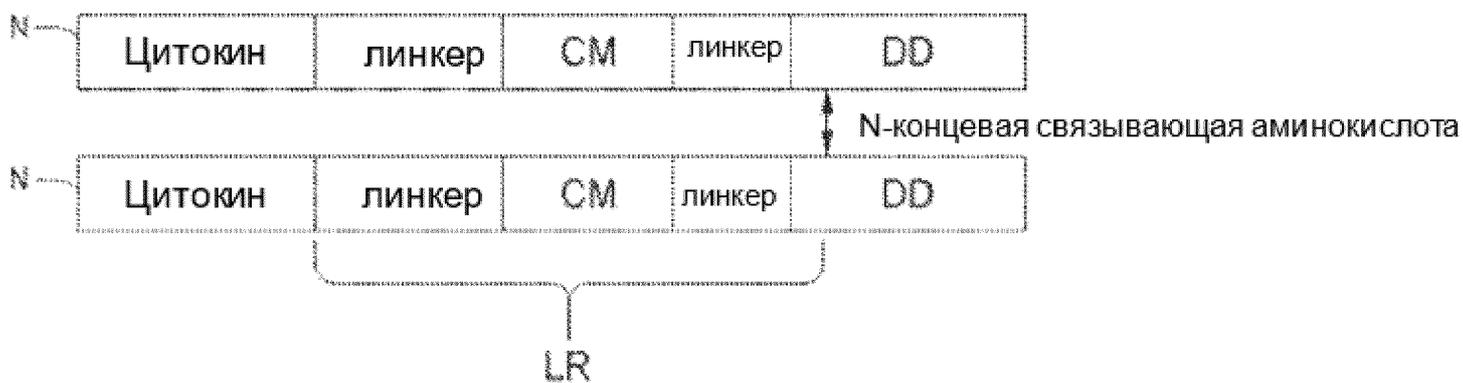
ФИГ. 12В



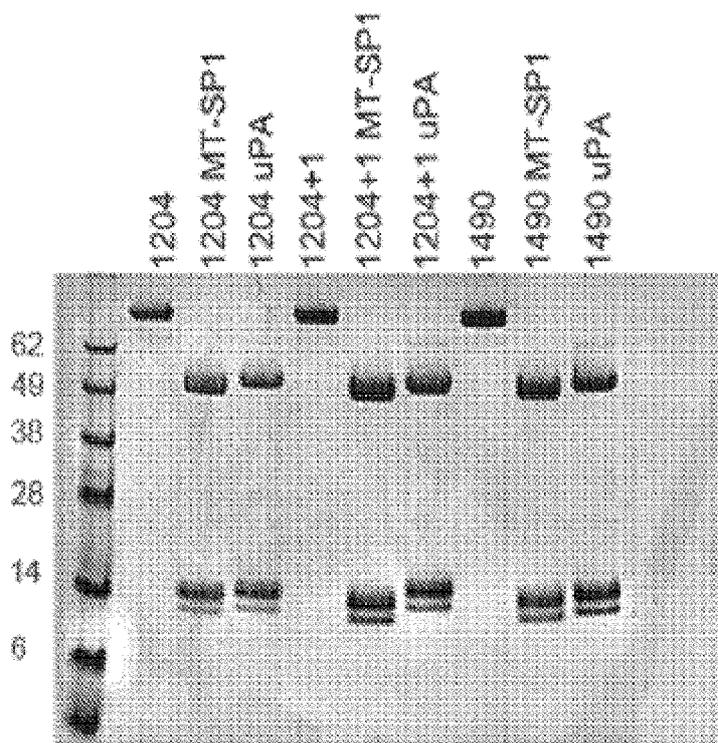
Фиг. 13А



Фиг. 13В



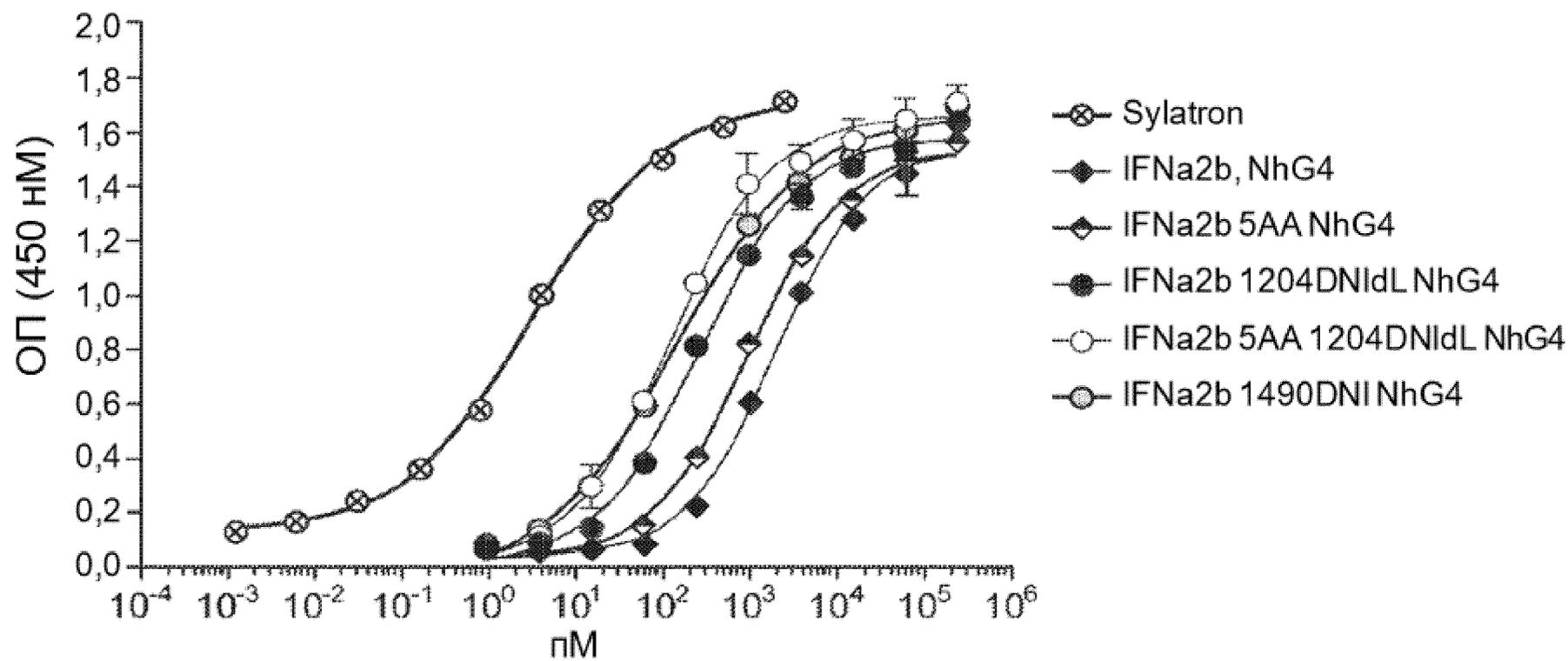
Фиг. 14



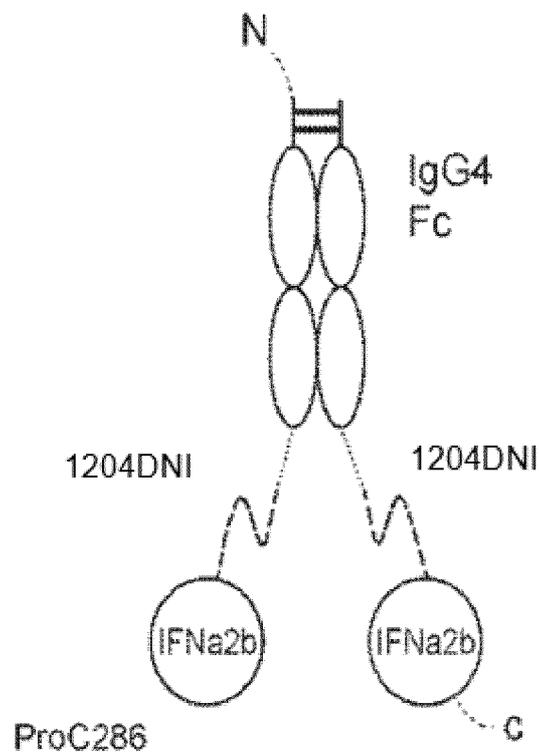
+1 обозначает конструкции с добавлением 5АА в линкеры

Фиг. 15

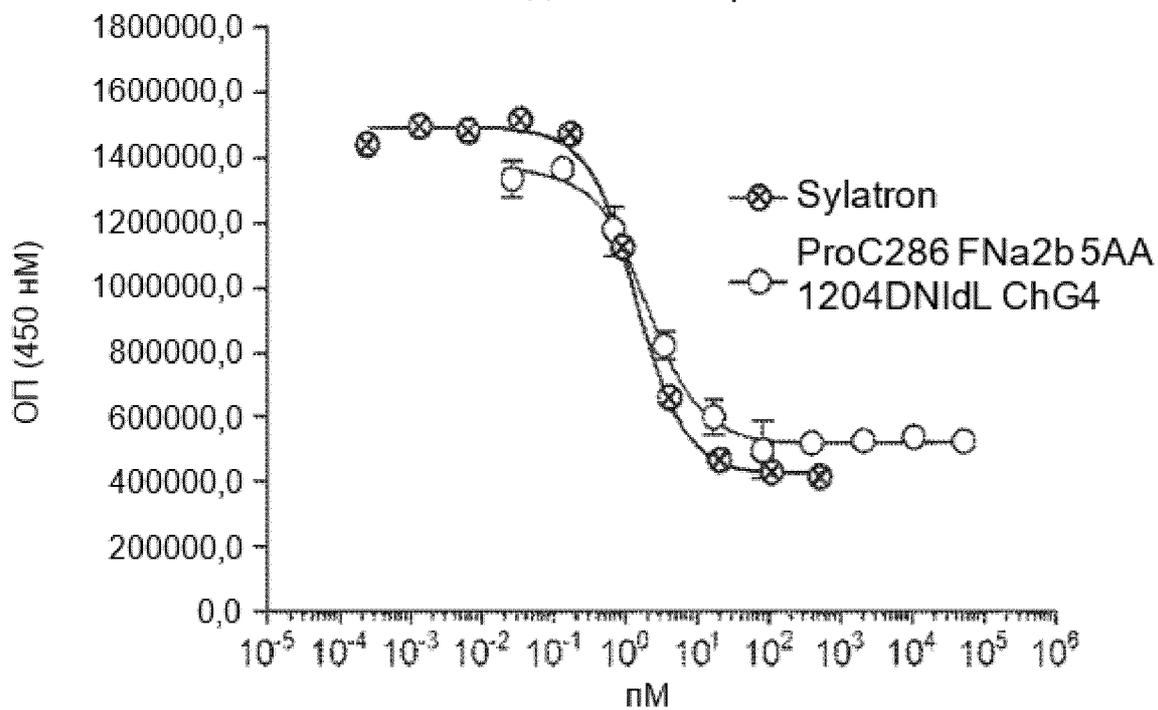
Репортерный анализ на основе HEK293: Маскированные слитые  
молекулы IFNa2b-Fc  
111419HA



Фиг. 16

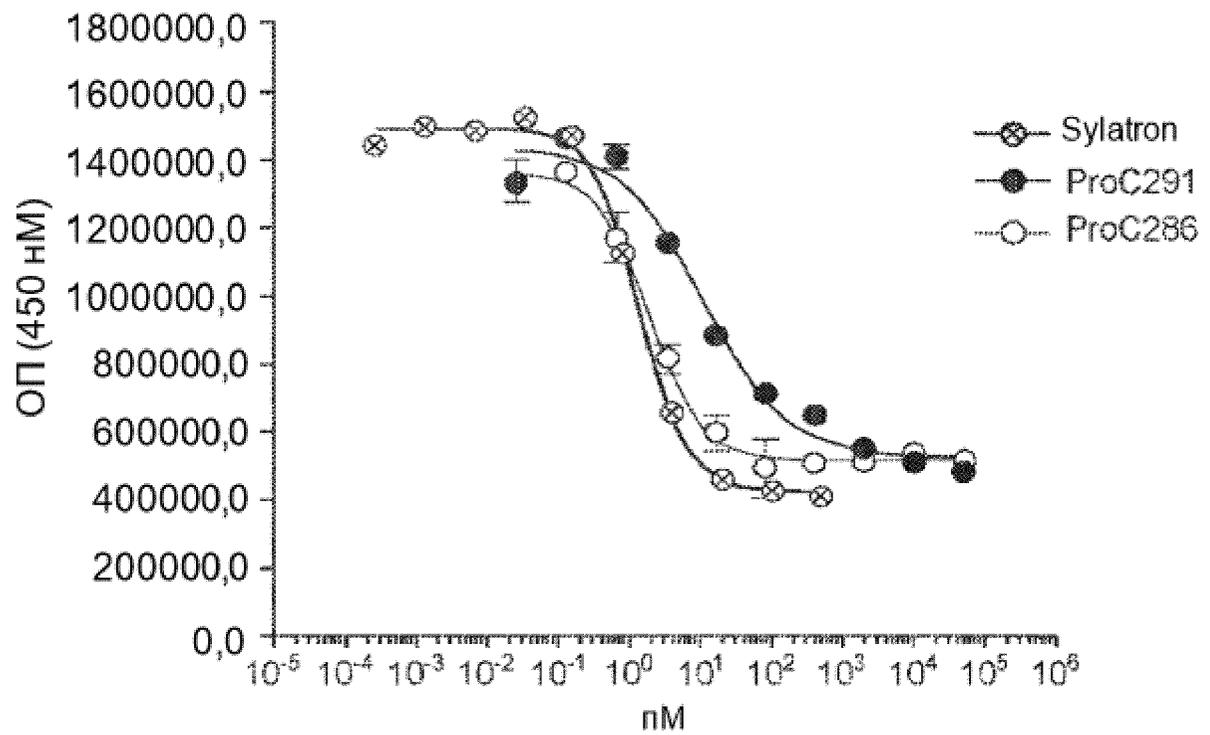
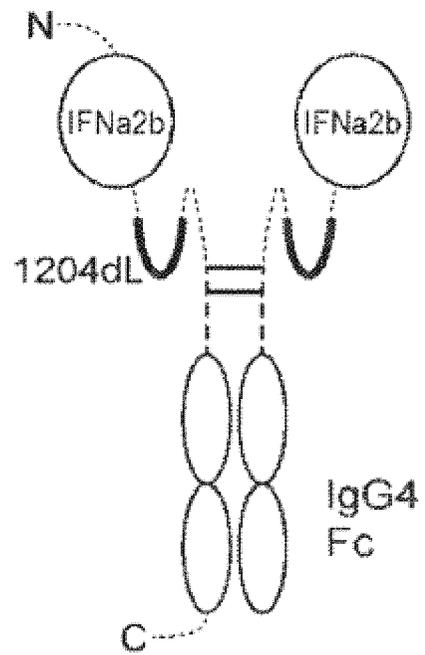


АТФ: Клетки Daudi + IFNa2b, 3-  
дневная обработка



Фиг. 17А

### Анализ пролиферации Daudi

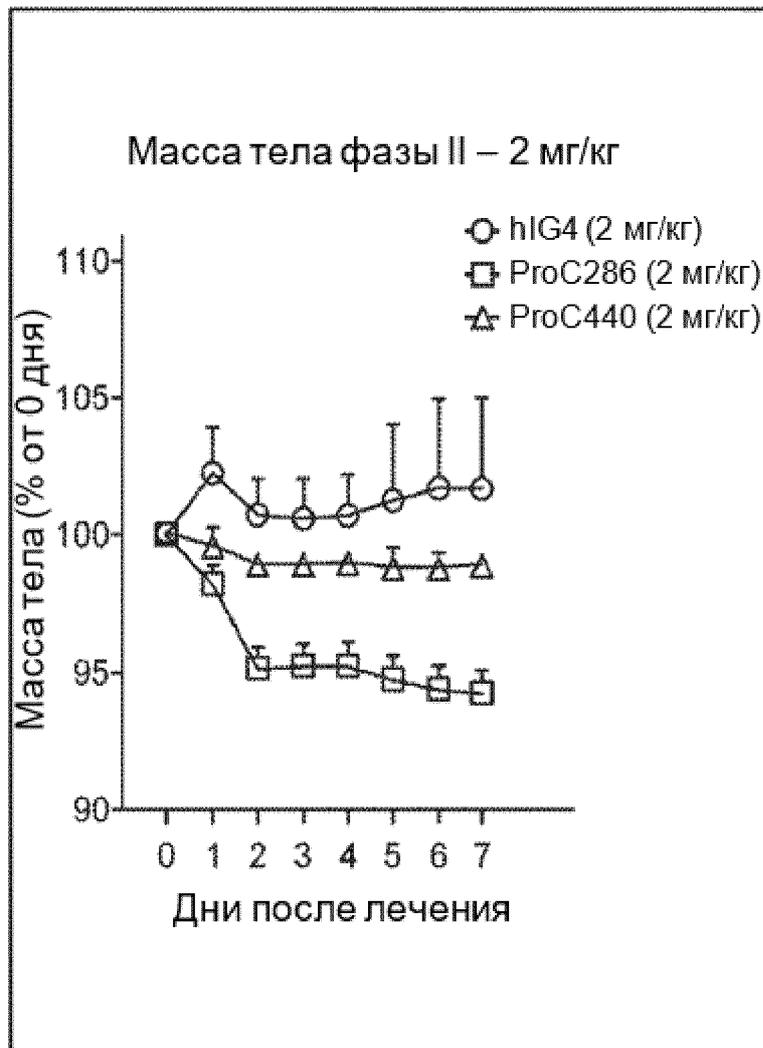


IFNa2b-Fc на N-конце 1 линкер 1204DN

IFNa2b 5AA 1204dL Nhg4 IFNa2b-hlgG4 5AA 1204DNIΔL ...RSKESGGGGSGR/SDNIGGGSESKYGPPCPPC.. PROC291

Фиг. 17В

2 мг/кг



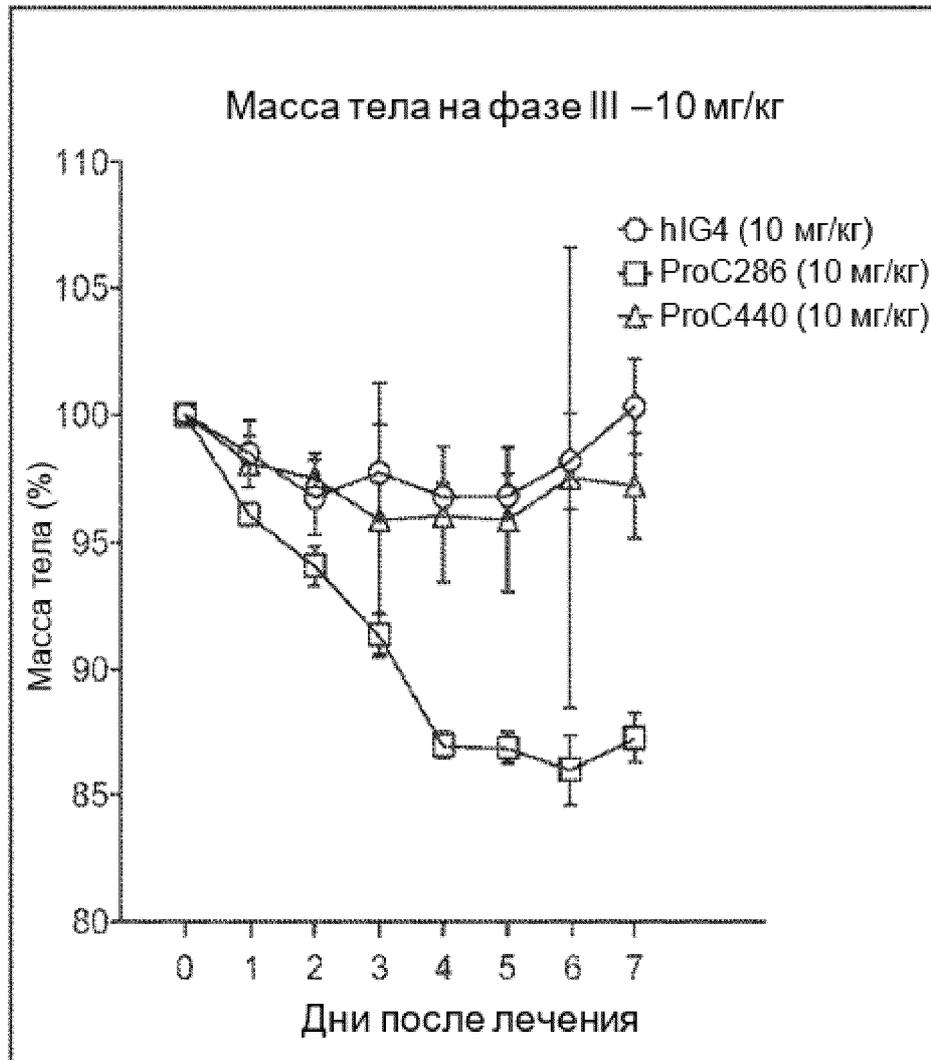
○ Контроль = hlgG4

□ Исследуемое соединение А = ProC286

△ Исследуемое соединение В = ProC440

Фиг. 18А

10 мг/кг



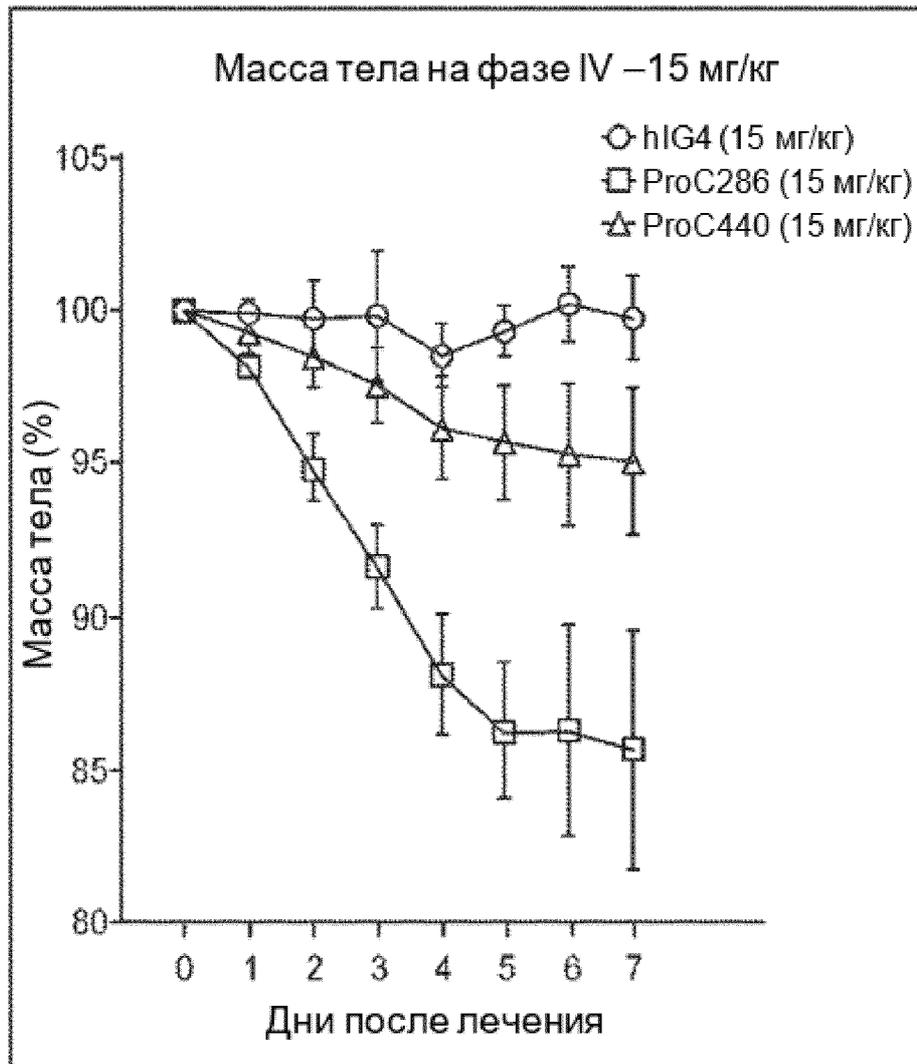
○ Контроль = hlgG4

□ Исследуемое соединение А = ProC286

△ Исследуемое соединение В = ProC440

Фиг. 18В

15 мг/кг

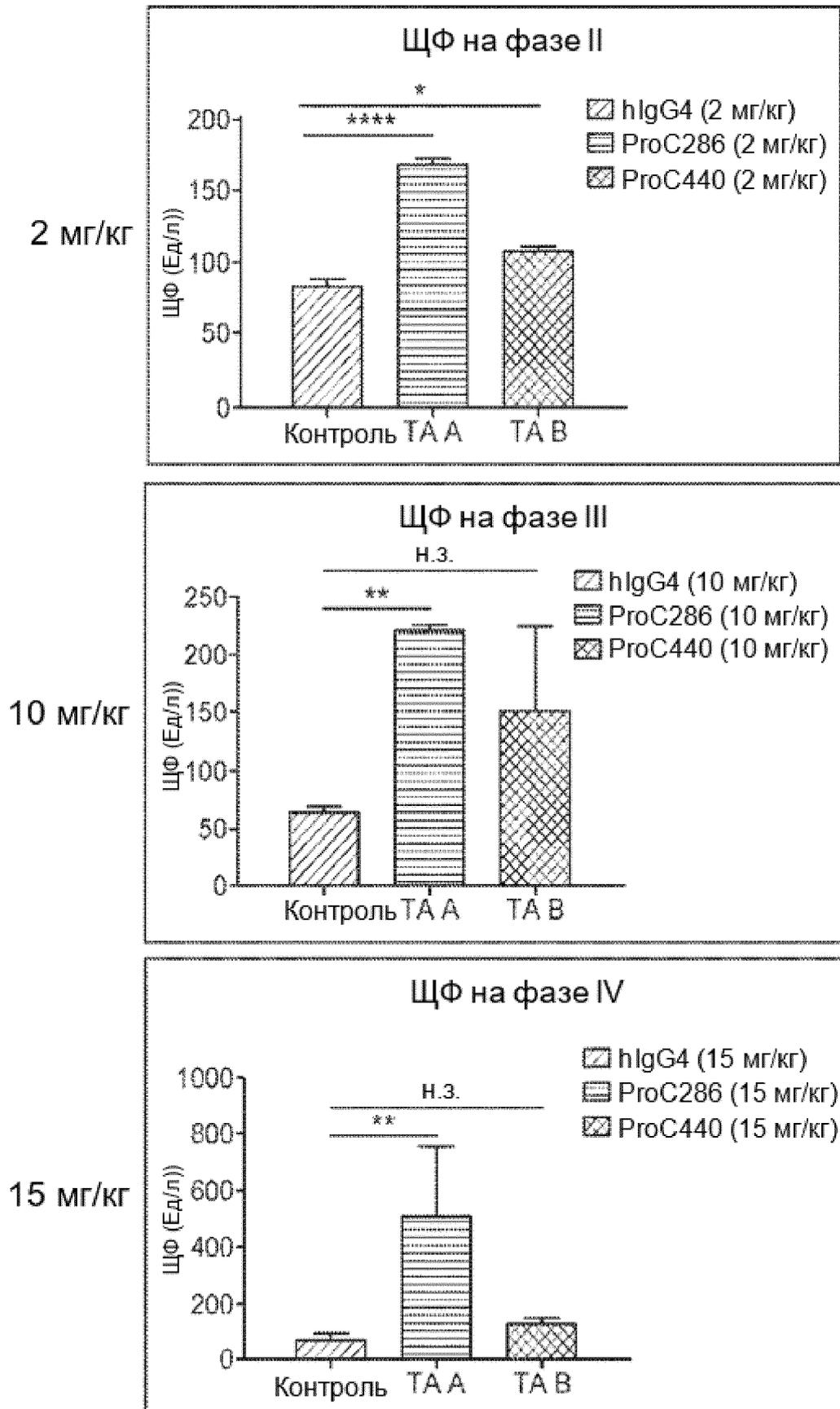


○ Контроль = hlgG4

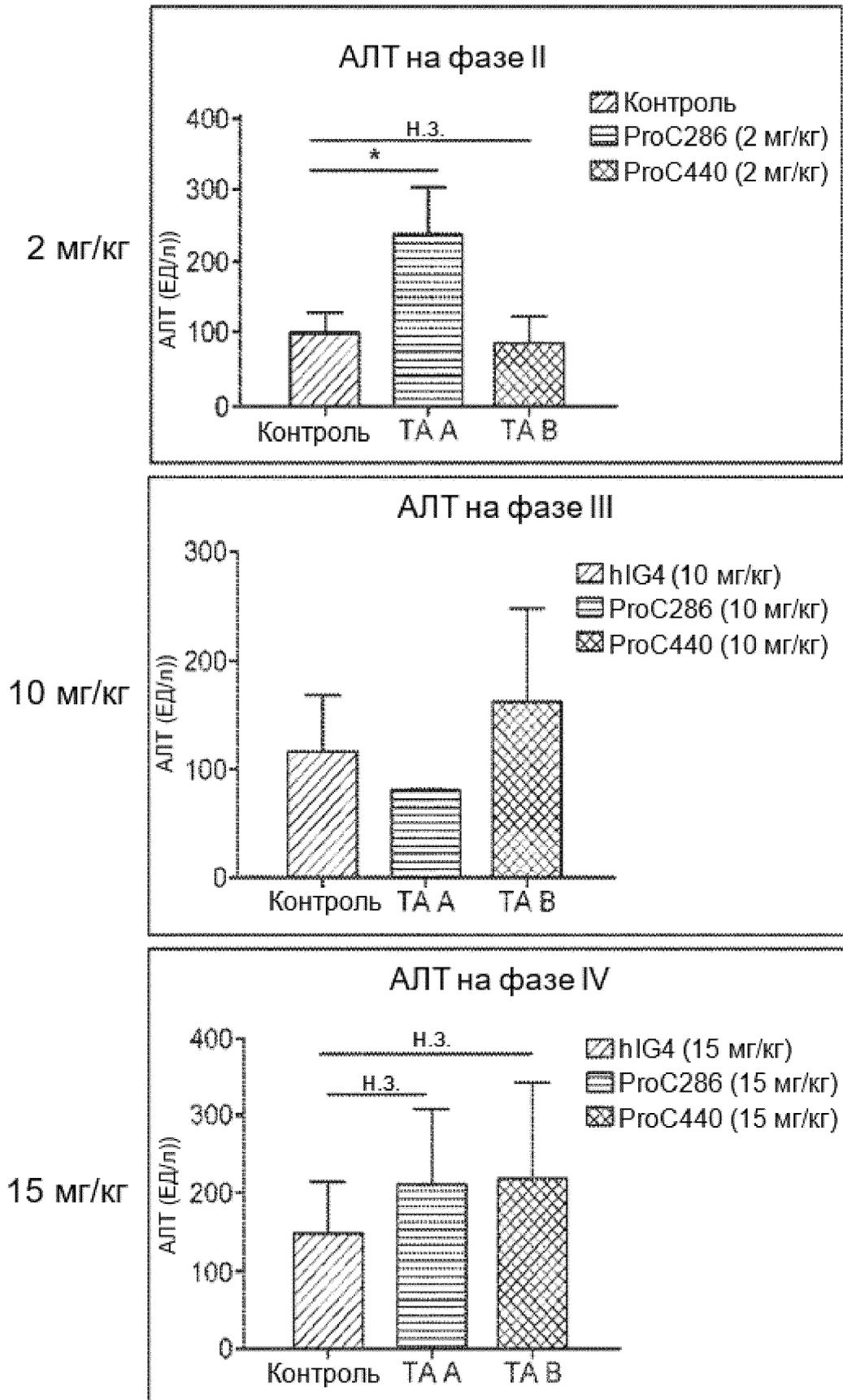
□ Исследуемое соединение А = ProC286

△ Исследуемое соединение В = ProC440

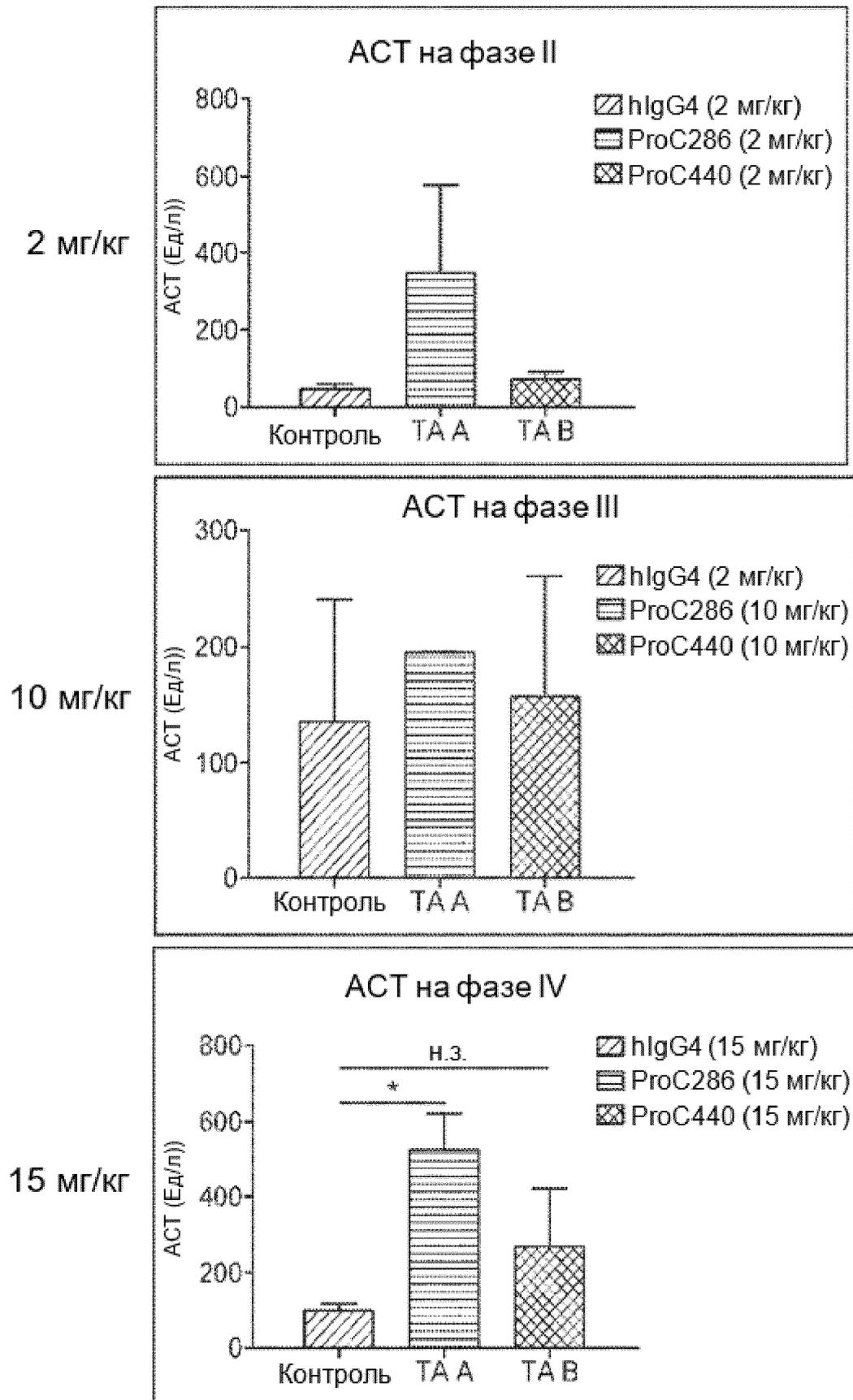
Фиг. 18С



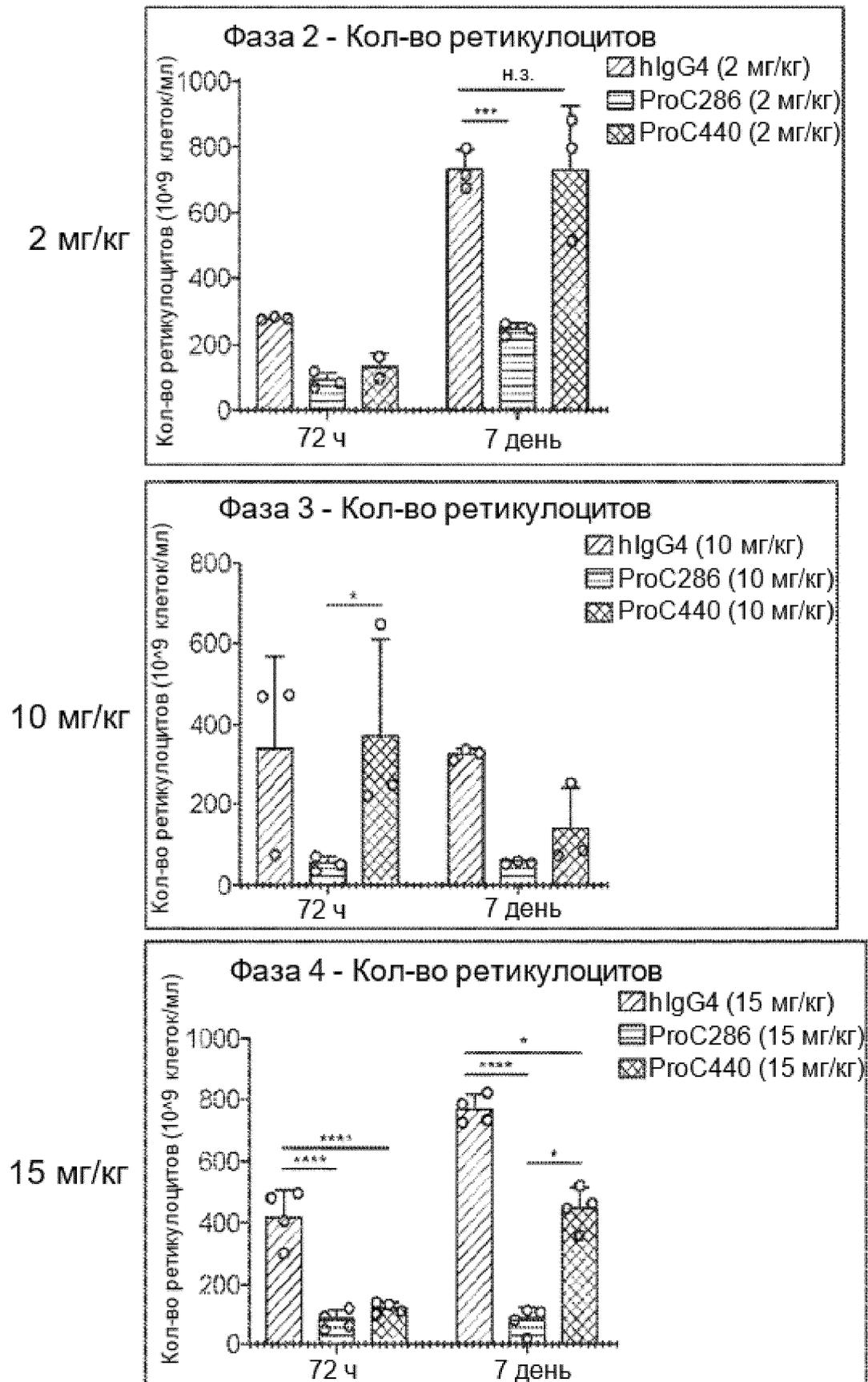
ФИГ. 19А



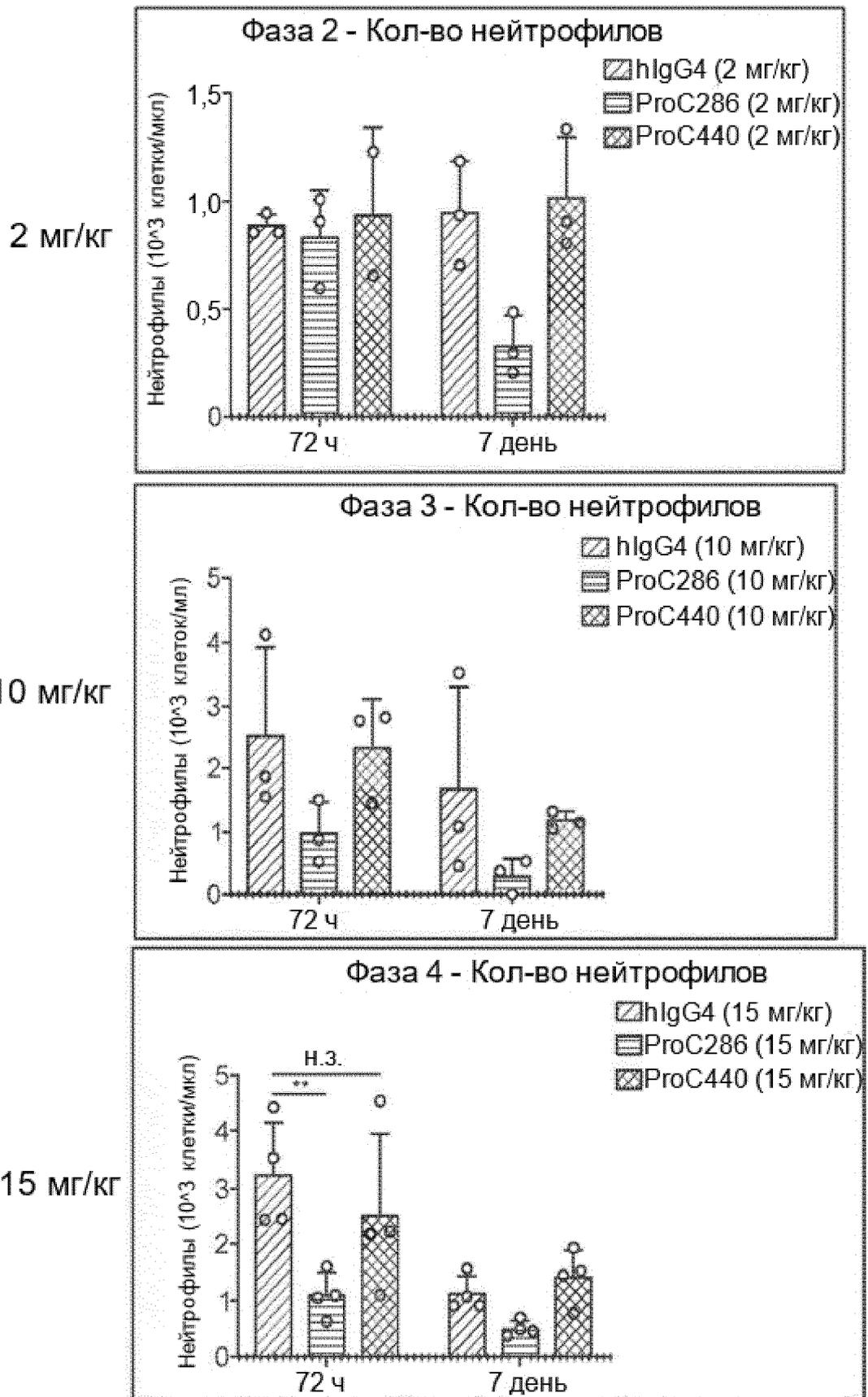
ФИГ. 19В



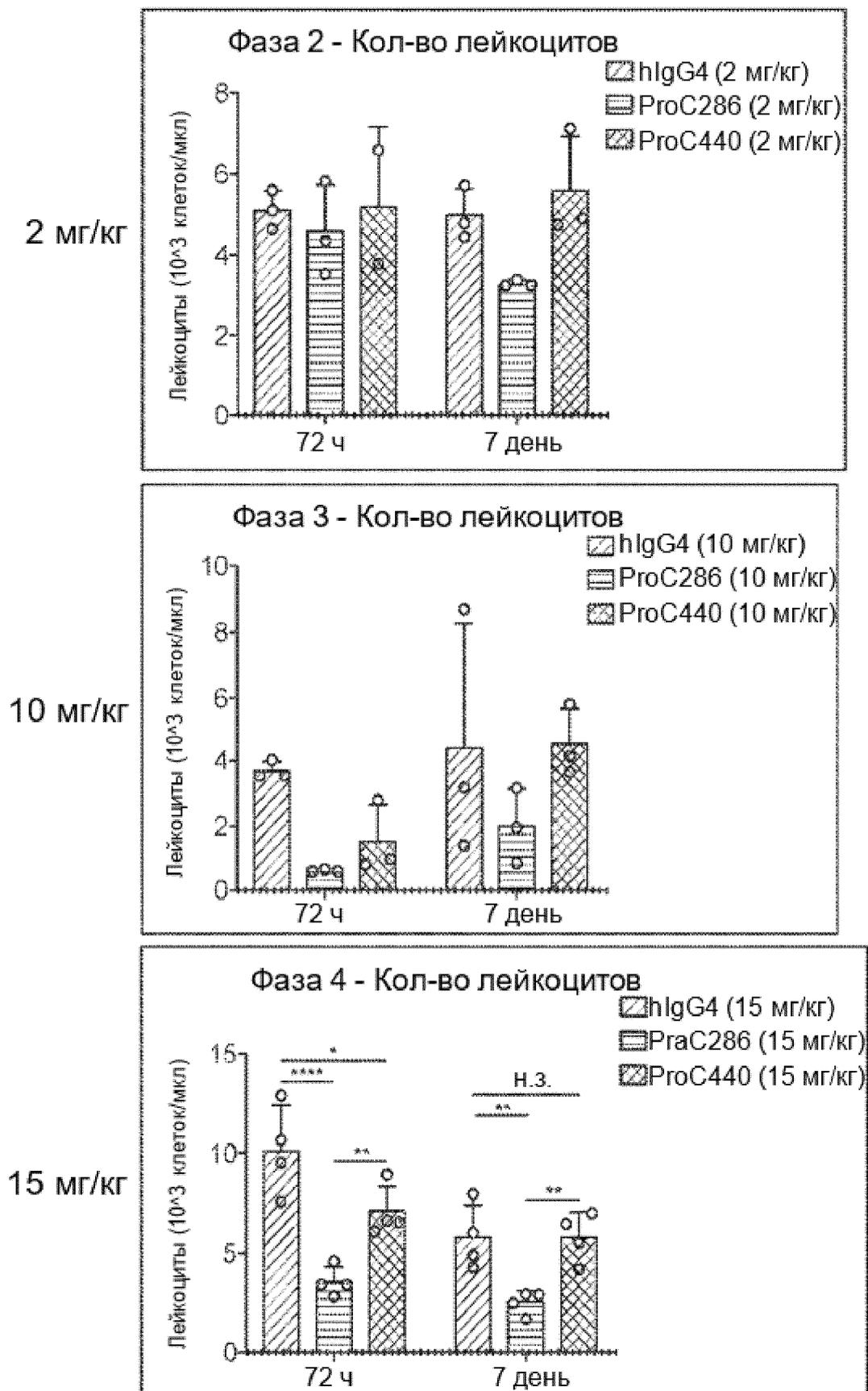
Фиг. 19С



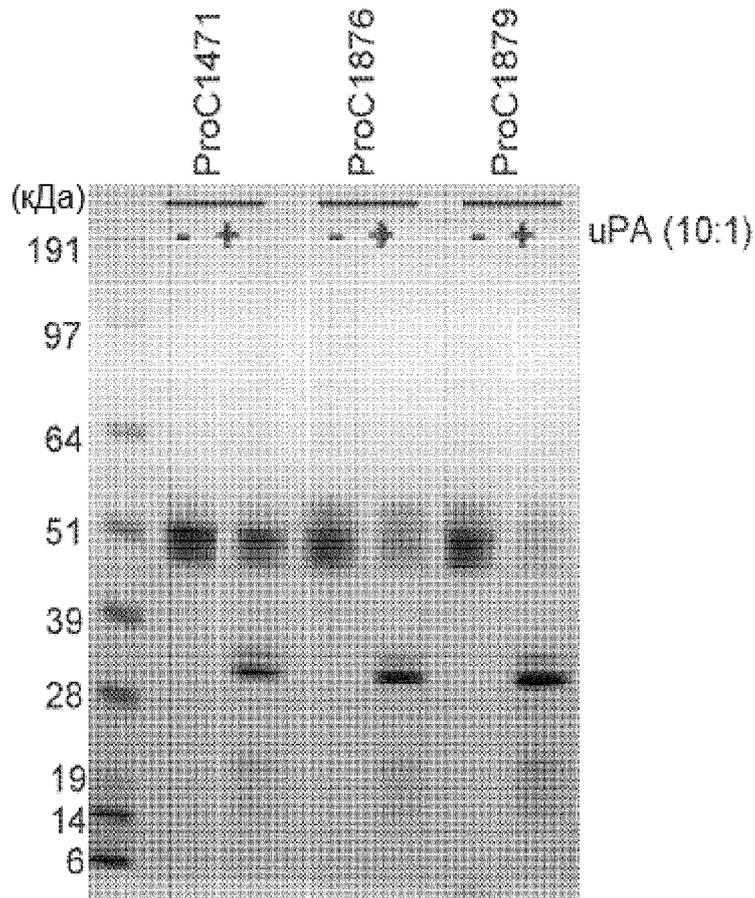
Фиг. 20А



Фиг. 20В

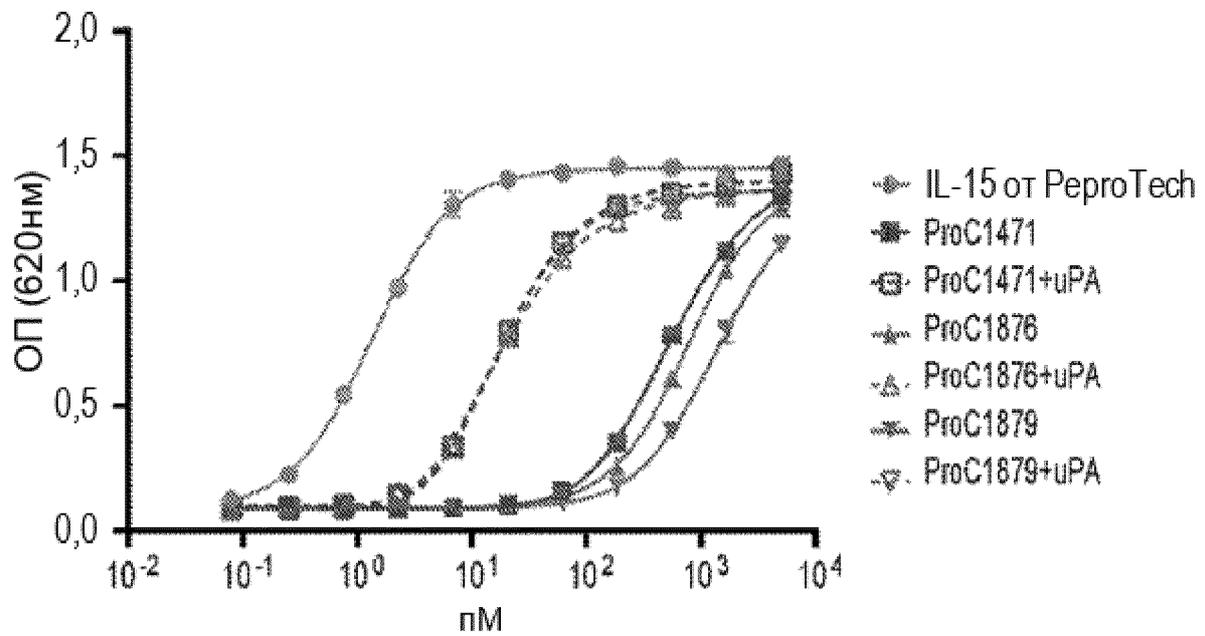


Фиг. 20С

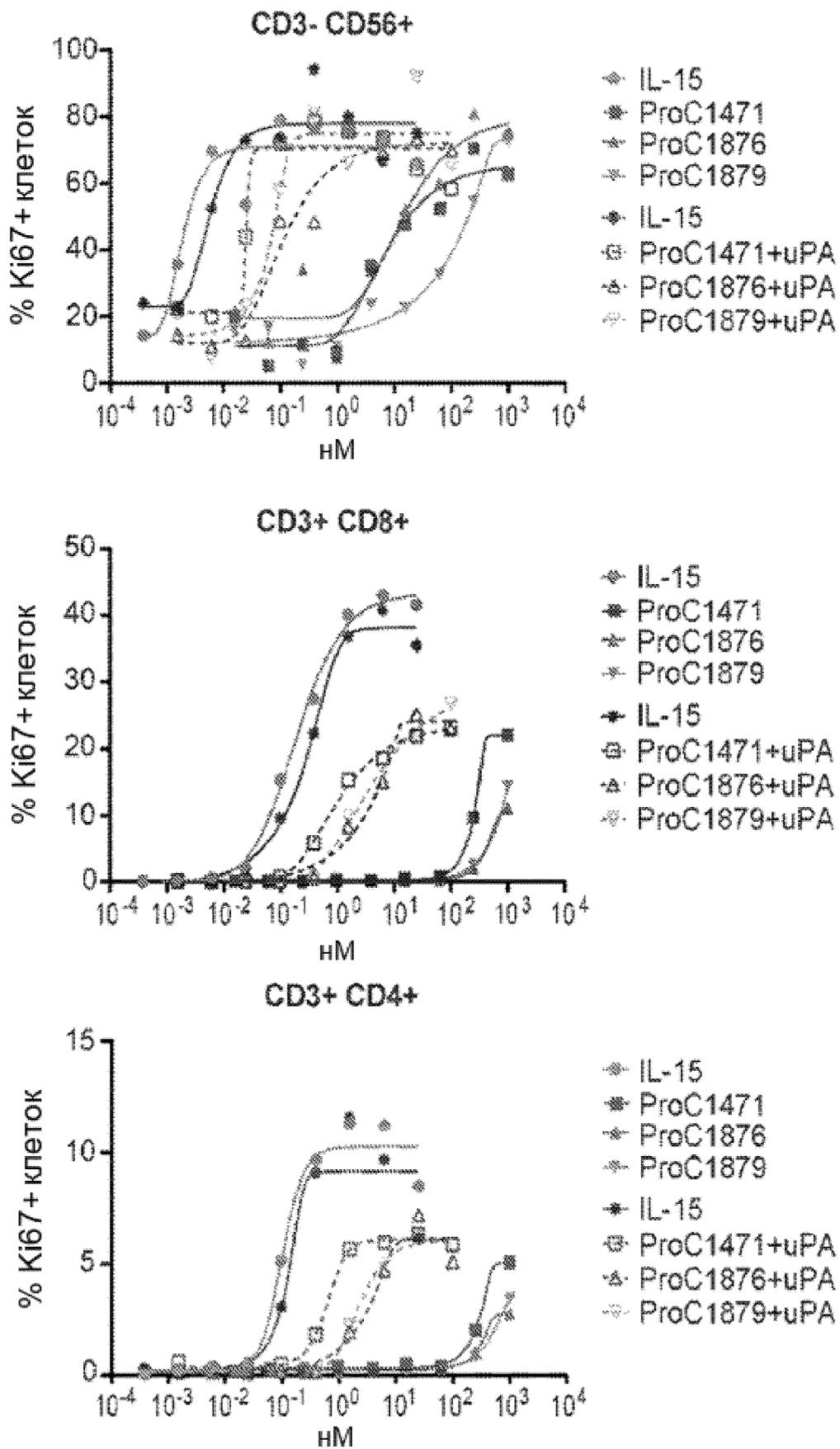


Фиг. 21А

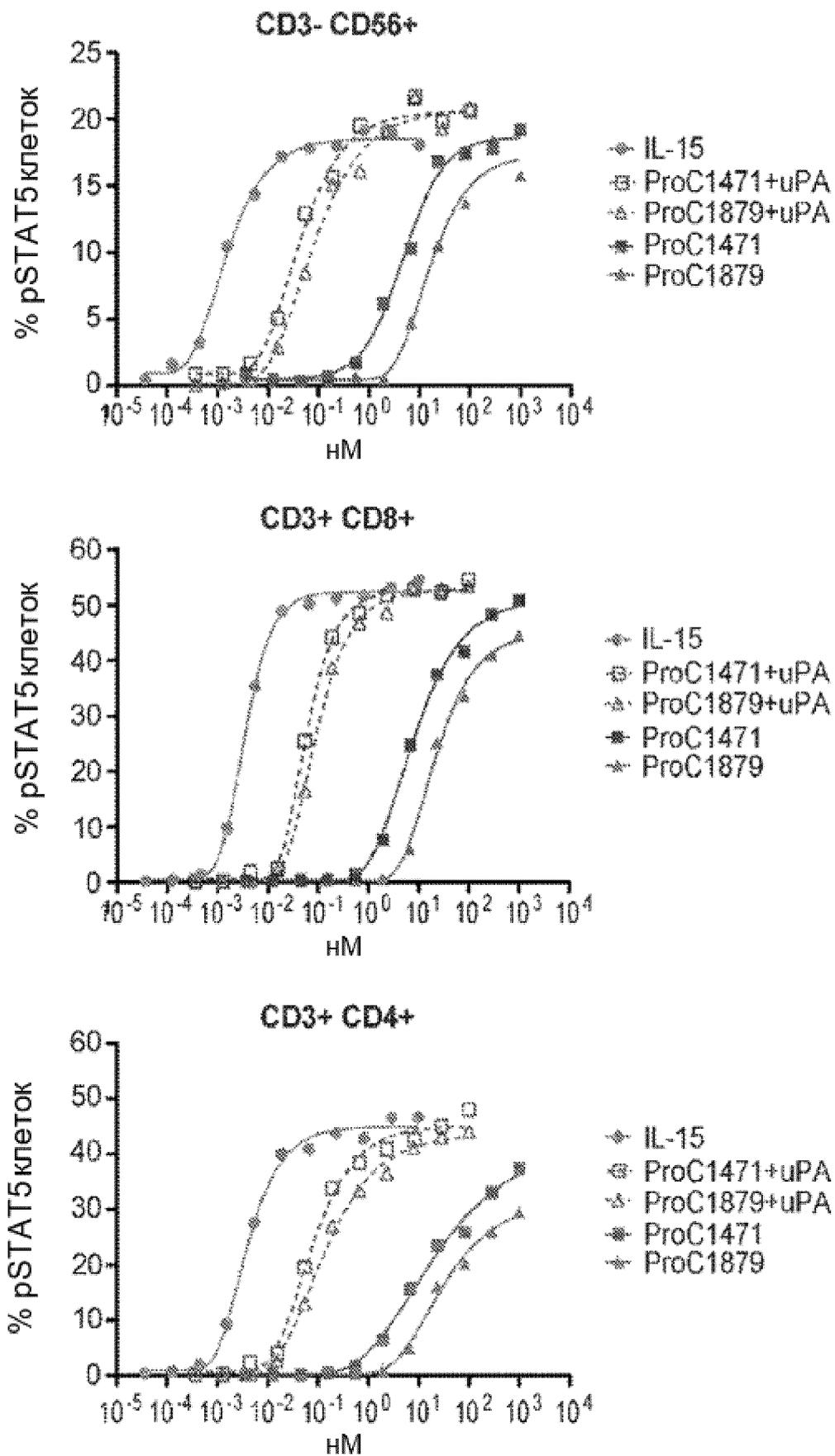
## Репортерный анализ HEK-Blue



Фиг. 21В



Фиг. 22



Фиг. 23