

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491682** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.11.02

(51) Int. Cl. *A61P 29/00* (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2023.01.30

(54) **ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ЦИТОКИНЫ И СПОСОБЫ**

(31) 22382073.9

(32) 2022.01.28

(33) EP

(86) PCT/EP2023/052202

(87) WO 2023/144393 2023.08.03

(71) Заявитель:

**ФУНДАСИО СЕНТРЕ ДЕ
РЕГУЛАСИО ГЕНОМИКА;
ИНСТИТУСИО КАТАЛАНА ДЕ
РЕСЕРКА И ЭСТУДИС АВАНСАТС
(ES)**

(72) Изобретатель:

**Дельгадо Бланко Франциско Хавьер,
Серрано Пубуль Луис, Монтеро Блай
Ариадна (ES)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) В изобретении раскрыты одноцепочечные димерные цитокины, обладающие улучшенной физиологической активностью по сравнению с мономерами цитокинов дикого типа. Одноцепочечные димерные цитокины по настоящему изобретению могут быть полезны при лечении различных заболеваний или расстройств, связанных с воспалительными состояниями или пролиферативными состояниями. Также раскрыты векторы доставки или агенты для доставки одноцепочечных димерных цитокинов субъекту. Такие векторы или агенты доставки включают клетки, бактерии и бактериофаги.

A1

202491682

202491682

A1

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ЦИТОКИНЫ И СПОСОБЫ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к новым терапевтическим цитокинам и способам их применения в терапии. В частности, изобретение относится к новым димерным цитокинам и, более конкретно, к димерным цитокинам с принудительной конформацией/структурно ограниченным и их применению в терапии.

Предшествующий уровень техники

Цитокины представляют собой биомолекулы, представляющие большой потенциальный интерес для терапии человека. Они модулируют иммунную систему и играют важную роль в развитии рака, воспалений, иммунного ответа, регенерации тканей и других. Несмотря на их огромный потенциал, существует лишь несколько цитокинов, одобренных для терапевтических целей. Это связано с тем, что многие из них могут иметь неблагоприятные побочные эффекты, поскольку они обычно нацелены на разные типы клеток, что усугубляет их низкий период полужизни в сыворотке, высокие производственные затраты, плейотропные эффекты, высокую токсичность и т. д. (см. Фигуру 2).

Были предложены различные способы улучшения фармакодинамики и фармакокинетики избранных цитокинов (например, объединение области IgG-Fc с IL-7² или применение адъювантного полиэтиленгликоля для многих из них³). Другие свойства, которые нуждаются в улучшении, включают их аффинность и устойчивость к протеолизу и/или их токсичность, которую можно частично решить путем создания поверхностных мутаций, нацеленных на взаимодействие с одним или более рецепторами для введения более низких доз, но максимизирующих терапевтический эффект⁴).

Одним из способов потенциально снизить токсичность цитокинов является их местная доставка с использованием терапевтической бактерии. Широко описано применение рекомбинантных бактерий, производящих и доставляющих *in situ* представляющую интерес терапевтическую молекулу⁵. Многие подобные попытки также показали высокую эффективность на животных моделях, но пока не принесли клинических успехов, отчасти из-за трудностей в достижении и поддержании достаточно эффективных концентраций терапевтической молекулы в месте заболевания. Тем не менее, надежда на эффективные способы лечения, которые можно будет производить дешево и назначать перорально или местно (например, *Cutibacterium Acnes* от акне; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31981578/>) и с минимальными системными побочными

эффектами поддерживает интерес к применению микробов в качестве терапевтических средств. Несколько компаний разрабатывают бактерии для терапии человека (например, Pulmobiotics, Eligo Bioscience, Synlogic, Azitra, Intrexon, Rebiotix) или используют бактериофаги, содержащие гены, представляющие интерес для экспрессии в целевых бактериях (например, Armata Pharmaceuticals, Eligo Bioscience).

Другим способом снижения токсичности и повышения эффективности может быть объединение цитокина с молекулой, которая направит цитокин к целевому сайту действия (например, с антителом), введение мутаций, которые изменяют относительную аффинность к одному из различных компонентов сборки рецептора, принимая во внимание в конечном итоге различный уровень экспрессии компонентов рецептора в разных клетках (например, IL2 и его рецептор альфа (IL-2RA)); или объединение цитокина с другими белковыми доменами, которые предотвращают распознавание рецептора и высвобождаются из цитокина в нужном месте.

На фоне вышеизложенного было бы желательно иметь новые и/или улучшенные терапевтические цитокины, методы лечения и/или способы улучшения периода полужизни, безопасности, эффективности, специфичности и/или местного нацеливания цитокинов при введении либо обычными способами, либо с использованием вектора биологической доставки.

Настоящее изобретение направлено на преодоление или, по меньшей мере, смягчение одного или нескольких недостатков предшествующего уровня техники.

Сущность изобретения

Изобретение относится к полипептиду одноцепочечного димерного цитокина, содержащему: (а) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где последовательность одного из доменов мономера цитокина или его функциональной части не является непрерывной и прерывается последовательностью другого домена мономера цитокина или его функциональной части.

В одном из воплощений последовательность первых доменов мономера цитокина или функциональной части не является непрерывной и прерывается последовательностью второго домена мономера цитокина или его функциональной части.

В некоторых аспектах этого воплощения первая часть последовательности первого домена мономера цитокина соответствует N-концевой части домена мономера природного цитокина, а вторая часть последовательности первого домена мономера цитокина соответствует C-концевой части домена мономера природного цитокина.

В других аспектах этого воплощения первая часть последовательности первого

домена мономера цитокина соответствует С-концевой части домена мономера природного цитокина, а вторая часть последовательности первого домена мономера цитокина соответствует N-концевой части домена мономера природного цитокина.

В другом воплощении последовательность вторых доменов мономера цитокина или его функциональной части не является непрерывной и прерывается последовательностью первого домена мономера цитокина или его функциональной части.

В некоторых аспектах этого воплощения последовательность первого домена мономера цитокина класса I или его функциональной части является непрерывной, тогда как последовательность второго домена мономера цитокина такова, что первая часть последовательности второго мономера цитокина класса I, которая расположена на N-конце первого мономера цитокина класса I или его функциональной части соответствует N-концевой части мономера природного цитокина класса I, а вторая часть последовательности второго мономера цитокина класса I, которая расположена на С-конец второго мономера цитокина класса I или его функциональной части соответствует С-концевой части мономера природного цитокина класса I.

В других аспектах этого воплощения последовательность второго домена мономера цитокина класса II или его функциональной части является непрерывной в прямом и обратном направлении по сравнению с порядком в его природной последовательности, тогда как последовательность второго домена мономера цитокина класса II такова, что первая часть последовательности первого домена мономера цитокина класса II, которая расположена на N-конце второго домена мономера цитокина класса II или его функциональной части, соответствует N-концевой части домена мономера природного цитокина класса II, и вторая часть последовательности первого домена мономера цитокина класса II, которая расположена на С-конце второго домена мономера цитокина класса II, или его функциональная часть соответствует С-концевой части домена мономера природного цитокина класса II.

В другом воплощении изобретение относится к полипептиду одноцепочечного димерного цитокина, который содержит первый мономер цитокина и второй мономер цитокина, которые образуют димеры обмениваемого домена, где линкерный пептид соединяет N-конец первого мономера цитокина с С-концом второго мономера цитокина.

Изобретение также относится к полипептиду, содержащему полипептид одноцепочечного димера по изобретению.

Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид одноцепочечного димера по изобретению или к полипептиду, содержащему его.

Изобретение также относится к экспрессирующему вектору, содержащему

нуклеиновую кислоту по изобретению.

Также предлагается клетка-хозяин, которая содержит нуклеиновую кислоту или экспрессирующий вектор по изобретению.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей полипептид одноцепочечного димера по изобретению или полипептид, содержащий его.

Также предлагается способ лечения заболевания, который включает введение одноцепочечного димерного полипептида по изобретению или полипептида, содержащего его, субъекту, нуждающемуся в этом, необязательно субъекту, которому будет полезно снижение или увеличение воспалительной реакции или скорости пролиферации клеток.

Изобретение также относится к одноцепочечному димерному полипептиду по изобретению или к полипептиду, содержащему его, для применения при лечении заболевания, необязательно заболевания, при котором будет полезно снижение или увеличение воспалительной реакции или скорости пролиферации клеток.

Изобретение также относится к одноцепочечному димерному полипептиду по изобретению или к полипептиду, содержащему его, для производства лекарственного средства для лечения заболевания, необязательно заболевания, при котором будет полезно снижение или увеличение воспалительной реакции или скорости пролиферации клеток.

В широком смысле настоящее раскрытие относится к структурному дизайну новых вариантов полипептидов цитокинов, которые могут оказывать благоприятные терапевтические эффекты. Такие терапевтические полипептиды могут быть доставлены целевому субъекту любым способом, доступным специалисту в данной области, например, перорально, с помощью спрея, инъекции или с использованием биологических векторов, таких как вирусы, бактериофаги и/или бактерии.

Новые варианты полипептида цитокина по настоящему раскрытию содержат пары последовательностей мономеров цитокина, которые ковалентно связаны с образованием одноцепочечных полипептидов. Последовательности мономеров цитокинов могут быть получены из одинаковых или разных белковых последовательностей цитокинов дикого типа. Преимущество заключается в том, что одноцепочечные полипептиды по раскрытию складываются с образованием третичной структуры, которая включает два структурных домена (например, левый и правый 3D-домены), при этом каждый 3D-домен может иметь функцию и/или активность мономера природного цитокина, на котором он основан/из которого получен; или может иметь другую функцию или активность.

В соответствии с одним аспектом раскрыт полипептид одноцепочечного димерного цитокина, содержащий: (a) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, при этом

первый домен мономера цитокина или его функциональная часть объединен со вторым доменом мономера цитокина или его функциональной частью с помощью пептидного линкера, причем последовательность пептидного линкера содержит 5 или менее (предпочтительно 3 или менее) смежных остатков Gly и/или Ser. Соответственно, сконструированный пептидный линкер имеет последовательность, содержащую от около 3 до около 20 аминокислот. В воплощениях сконструированный пептидный линкер содержит от около 3 до около 16 аминокислот; от около 3 до около 12 аминокислот; от около 3 до около 8 аминокислот; от около 4 до около 8 аминокислот; или от около 4 до около 6 аминокислот.

В соответствии со вторым аспектом раскрыт полипептид одноцепочечного димерного цитокина, содержащий: (a) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где последовательность второго домена мономера цитокина или его функциональная часть вставлена в последовательность первого домена мономера цитокина так, что первая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на N-конце второго мономера цитокина или его функциональной части, а вторая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на C-конце второго мономера цитокина или его функциональной части. Преимущество заключается в том, что полипептид одноцепочечного димерного цитокина имеет третичную структуру, включающую левый 3D-домен цитокина и правый 3D-домен цитокина, причем левый 3D-домен цитокина соединен с правым 3D-доменом цитокина двумя мостиковыми линкерными пептидами. В воплощениях левый 3D-домен цитокина предпочтительно представляет собой цитокин с расщепленным доменом, образованный из первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина или его функциональной части, а правый 3D-домен цитокина предпочтительно представляет собой цитокин с непрерывным доменом, образованный из второго домена мономера цитокина или его функциональной части.

В соответствии с третьим аспектом раскрыт полипептид одноцепочечного димерного цитокина, содержащий: (a) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где последовательность второго домена мономера цитокина или его функциональная часть вставлена в последовательность первого домена мономера цитокина так, что первая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на N-конце второго мономера цитокина или его функциональной части, а вторая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на C-конце

второго мономера цитокина или его функциональной части. В различных воплощениях первая часть последовательности первого домена мономера цитокина соответствует С-концевой части мономера природного цитокина, а вторая часть последовательности первого домена мономера цитокина соответствует N-концевой части мономера природного цитокина.

В соответствии с четвертым аспектом раскрыт полипептид одноцепочечного димерного цитокина, содержащий: (a) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где последовательность первого домена мономера цитокина получена из типа цитокина, отличного от последовательности второго домена мономера цитокина; и где левый домен цитокина представляет собой цитокин с расщепленным доменом, образованный из первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина или его функциональной части, а правый 3D-домен цитокина представляет собой цитокин с непрерывным доменом, образованный из второго домена мономера цитокина или его функциональной части. Соответственно, полипептид одноцепочечного димерного цитокина имеет третичную структуру, включающую левый 3D-домен цитокина, образованный из первого домена мономера цитокина или его функциональной части, и правый 3D-домен цитокина, образованный из второго домена мономера цитокина или его функциональной части. Полезно то, что первый домен мономера цитокина соединен со вторым доменом мономера цитокина двумя мостиковыми линкерными пептидами. В воплощениях первый домен мономера цитокина происходит из цитокина класса II, а второй домен мономера цитокина происходит из цитокина класса I; или первый домен мономера цитокина происходит из цитокина класса I, а второй домен мономера цитокина происходит из цитокина класса II.

В соответствии с пятым аспектом раскрыт полипептид одноцепочечного димерного цитокина, содержащий: (a) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где последовательность первого домена мономера цитокина получена из типа цитокина, отличного от последовательности второго домена мономера цитокина; и где полипептид одноцепочечного димерного цитокина имеет третичную структуру, включающую левый 3D-домен цитокина, образованный из первого домена мономера цитокина или его функциональной части, и правый 3D-домен цитокина, образованный из второго домена мономера цитокина или его функциональной части. В различных воплощениях: (i) последовательность первого домена мономера цитокина получена из последовательности цитокина IL-10 или IFN γ , а последовательность второго домена мономера цитокина

получена из последовательности цитокина класса I или класса II; или (ii) последовательность первого домена мономера цитокина получена из последовательности цитокина класса I или класса II, а последовательность второго домена мономера цитокина получена из последовательности цитокина IL-10 или IFN γ .

Настоящее раскрытие также охватывает выделенные полинуклеотиды, которые включают любой полипептид по изобретению. Также включены векторы, содержащие такие полинуклеотиды, такие как на основе бактериофагов или вирусные векторы.

Кроме того, раскрытие охватывает клетки, содержащие полинуклеотиды по раскрытию, и/или клетки, экспрессирующие полипептиды по раскрытию.

Раскрытие также относится к фармацевтическим композициям, содержащим полипептиды, полинуклеотиды, векторы и/или клетки по настоящему раскрытию.

Кроме того, раскрытие относится к терапевтическим применениям и способам медицинского лечения, включающим полипептиды, полинуклеотиды, векторы, клетки и/или (фармацевтические/терапевтические) композиции по настоящему раскрытию.

Различные аспекты и воплощения раскрытия определены в разделах и/или прилагаемой формуле изобретения. Дополнительные аспекты и воплощения концепций изобретения описаны в других местах настоящего документа.

Следует понимать, что любые признаки одного аспекта или воплощения изобретения могут быть объединены с любой комбинацией признаков любого другого аспекта или воплощения изобретения, если не указано иное, и такие комбинации попадают в объем заявленного изобретения. Таким образом, изобретение охватывает все пункты и формулы настоящего раскрытия в любых комбинациях, если только такая комбинация не является несовместимой.

Краткое описание чертежей

Изобретение дополнительно проиллюстрировано прилагаемыми чертежами, на которых:

Фигура 1: Схематическая иллюстрация общей концепции фолдикина. Основная концепция фолдикина представляет собой одноцепочечную молекулу, состоящую из непрерывной последовательности свернутого цитокинового домена и 3D-пространства (прозрачная лента; правая сторона), соединенной через N- и C-концы (линкер Xn, выделенный серым цветом, который может представлять собой природные N- и C-концы или который может возникнуть в результате размыкания петли в природной последовательности с образованием новых N- и C-концов в сочетании с закрытием природных N- и C-концов линкером NtCt – также показано серым цветом) с другим доменом на основе цитокина, который расщеплен на две части одинакового или разного

размера (показано черным и средне-серым, левая сторона), где N- и C-концы образующейся молекулы фолдикина могут быть природными N- и C- концами второго (левая сторона) домена цитокина или новыми N- и C-концами, образующимися в результате расщепления второго домена цитокина. В этом конкретном примере проиллюстрирован фолдкин, созданный на основе цитокина типа II, в котором природные N- и C-концы мономера цитокина, образующего непрерывный 3D-домен, связаны с сконструированной линкерной последовательностью (NtCt). Для создания гибридной структуры димера была разомкнута петля, которая естественным образом соединяет α -спирали 3 и 4 в двух мономерах, и вновь созданные N- и C-концы обоих доменов были связаны с помощью двух созданных Xn линкеров (показано серым). Таким образом, непрерывный 3D-домен (спирали 1B–6B отмечены светло-серым цветом) соединен с двумя половинками (спирали 1A–3A помечены черным цветом и спирали 4A–6A помечены серым), соответственно, прерывистого 3D-домена. Спирали нумеруются в том порядке, в котором они появляются в последовательности для каждого домена природного мономерного фолдикина (спирали 1A - 6A). В непрерывном 3D-доме фолдикина согласно этому воплощению порядок спирали в направлении от N-конца к C-концу соответствует 4B, 5B, 6B, 1B, 2B, 3B). Число спиралей варьирует в зависимости от цитокинов, на основе которых образуется фолдкин. Например, цитокин типа I обычно включает 4 консервативные α -спирали, тогда как цитокин типа II обычно включает 6 консервативных α -спиралей. Разработанные линкеры показаны в виде ленты с показанным остовом белка (атомы N, CA, CO).

Фигура 2: Блок-схема, иллюстрирующая проблему цитокинов и ее решение с использованием фолдикинов.

Фигура 3: Схематическая иллюстрация процесса образования фолдикина на основе димерного цитокина типа II с обмениваемым доменом. N-ter A и C-ter A обозначают N- и C-концы первого мономера цитокина, а N-ter B и C-ter B обозначают N- и C-концы второго мономера цитокина из димера с обмениваемым доменом. Фолдкин с обмениваемым доменом, такой как IL-10, состоит из двух цепей (темные и серые спирали), образующих два цитокиновых домена, состоящих из N- и C-областей каждой молекулы. Петля, показанная черным цветом, представляет собой новый линкер (линкер N-C), предназначенный для соединения N-конца одного из мономеров цитокина (в этом примере мономера B) с C-концом другого мономера цитокина (в этом примере мономер A) с получением «непрерывного фолдикинового домена» (см. также Фигуру 25), соединенного двумя линкерами с расщепленным доменом (левый 3D-домен).

Фигура 4: Схематическая иллюстрация процесса создания фолдикина в согласно

способу В на основе двух мономерных цитокинов класса I с короткой или длинной цепью. N-ter A и C-ter A обозначают N- и C-концы одного из исходных мономеров цитокинов или дикого типа (A), а N-ter B и C-ter B обозначают N- и C-концы другого из исходных мономеров цитокина (B), которые образуют димерный цитокин. Петля, показанная черным цветом в домене цитокина A, является иллюстративной и представляет собой петлю, которая в этом примере открывается для создания фолдикина в комбинации с соединением исходных N-ter A и C-ter B и исходных N-ter B и C-ter A мономеров A и B (показаны с черными линкерами; в центре) для создания одноцепочечного фолдикина. На этой иллюстрации пептидная петля в домене A раскрыта (см. также Фигуры 6 и 27) с образованием N- и C-концов фолдикина. В других воплощениях различные петли между спиральями могут быть раскрыты в домене A для образования новых N- и C-концов. В других воплощениях петля цитокина B может быть раскрыта для образования новых N- и C-концов.

Фигура 5: Схематическая иллюстрация процесса создания фолдикина согласно способу A на основе двух мономерных цитокинов класса II. N-ter A и C-ter A обозначают N- и C-концы одного из исходного мономера цитокина или мономера цитокина дикого типа (A), а N-ter B и C-ter B обозначают N- и C-концы другого исходного мономера цитокина (B). Петли, показанные черным цветом (верхняя левая панель), являются иллюстративными и представляют собой две петли, которые раскрываются для создания новых N- и C-концов (N-N-ter A и B и N-C-ter A и B; верхняя правая панель). Эти новые N- и C-концы могут быть соединены с новыми пептидными линкерами (обозначены маленькими черными стрелками; нижняя правая панель). Исходные N-ter и C-ter одного из двух исходных мономеров цитокина дикого типа (в данном примере цитокина B) затем соединяются с новым пептидным линкером (маленькая черная стрелка; нижняя левая панель) с образованием единого полипептида с двумя фолдикиновыми доменами: непрерывный домен (справа), зажатый между двумя частями расщепленного домена (слева – см. также Фигуру 27).

Фигура 6: Схематическая иллюстрация процесса создания химерного фолдикина на основе мономерного цитокина класса I и мономерного цитокина класса II. Согласно способу B, N-ter A и C-ter A обозначают N- и C-концы исходного/дикого типа мономера цитокина класса II (i), а согласно способу C, N-ter B и C-ter B обозначают N- и C-концы исходного/дикого типа мономера цитокина класса I (ii) (см. верхний левый угол на панелях A и B). Проиллюстрированы две возможные стратегии создания фолдикина, состоящего из мономеров типа I и типа II. (i) N-конец одного мономера ковалентно связан с C-концом другого мономера и наоборот, с получением единого полипептида (см. черные

линии, верхняя правая панель). Кроме того, линкерная область между соседними альфа-спиралями в одном из исходных доменов мономера (см. черную линию; нижняя правая панель) раскрывается с созданием новых N- и C-концов (N-N-ter и N-C-ter; нижняя левая панель) в фолдикине. В изображенном воплощении новые концы создаются в исходной последовательности цитокина типа I домена B (см. также Фигуры 4 и 27). (ii) Линкерная область/петля размыкается в цитокине типа II (цитокине A) с созданием новых N- и C-концов (N-N-ter и N-C-ter; панель вверху справа). Тогда новый N-конец (N-N-ter) мономера A ковалентно связан с природным C-концом (C-ter B) мономера B, а новый C-конец (N-C-ter) мономера A ковалентно связан с природным N-концом (N-ter B) мономера B для соединения двух молекул (см. черные линии с помеченным Xp; нижняя правая панель) с созданием Фолдикина II-I. Альтернативно, природные N- и C-концы мономера A соединяются (NtCt) с образованием непрерывного домена кольцевого перестановочного элемента из мономера A, а линкерная область/петля размыкается в цитокине типа I (мономер B) для создания новых N- и C-концов (внизу слева), образующих фолдикин I-II.

Фигура 7: Схематическая иллюстрация, показывающая, как структура цитокина типа II с обмениваемым доменом (SC-II10) может использоваться в качестве эталона для наложения двух мономеров цитокина типа II, A и B. На первой стадии мономеры A и B накладываются на соответствующие свернутые 3D-домены шаблона обмениваемого домена для создания желаемого относительного положения и ориентации мономеров A и B. На второй стадии противоположная петля между спиралями каждого мономерного домена размыкается для создания новых N- и C-концов каждого мономера, которые соединяются с совместимыми новыми концами противоположного мономера с образованием пары мостиковых линкеров, соединяющих мономеры (как показано на фигурах 3-6). Длины и состав последовательностей мостикового линкера могут быть определены путем моделирования оптимальных последовательностей линкера с учетом конформации последовательности и структуры каждого мономера, чтобы сформировать двухдоменный фолдикин, который поддерживает оптимальную или желаемую структурную конформацию и геометрическую конфигурацию между двумя доменами фолдикина. На другой стадии природные N- и C-концы одного из мономеров (A или B) соединяются, замыкая один из мономеров и создавая одноцепочечный полипептид фолдикина. Мономер A или B, который замыкается путем соединения своих естественных N- и C-концов, становится «непрерывным» доменом в последовательности и трехмерном пространстве.

Фигура 8: Схематическое изображение структурных подтверждений трех различных димеров цитокинов с обмениваемым доменом дикого типа при связывании с

соответствующими рецепторами, показывающее угол между двумя половинами димерного цитокина и их приблизительную ориентацию относительно клеточной мембраны: (А) IFN γ цитокин с указанными рецепторами R1 и R2 и имеющий V-угол между левым и правым доменами; (В) Цитокин IL-10 с указанными рецепторами R1 и R2 и имеющий V-угол между левым и правым боковыми доменами; и (С) Цитокин IL-5, связанный с одним рецептором и имеющий плоский угол в 180 градусов между двумя структурными 3D-доменами. Фолдикины согласно настоящему изобретению соответствующим образом сконструированы и сконфигурированы с ковалентными пептидными линкерами для ограничения/стимулирования третичной структуры, которая имитирует четвертичную структуру димера цитокина дикого типа с обмениваемым доменом.

Фигура 9: Влияние рекомбинантного IL-10 или IL-10, секретируемого бактериями, на первичные клетки моноцитов. (А), (В) Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) данных проточной цитометрии клеток от доноров-человека (n = 4) для противовоспалительных маркеров (CD163, CD16, MerTK, CCR4 и PDL1) и провоспалительных маркеров (MHC2) и CD86) после добавления среды моноцитов (контроль) или рекомбинантного hIL-10 (hIL-10r) (А) или добавления надосадочной жидкости от *M. pneumoniae* (контроль) дикого типа (WT) или *M. pneumoniae*, экспрессирующих ORF IL-10 (WT_IL10) (В). Светло-серые столбцы представляют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) для контрольных условий; темно-серые столбцы представляют MFI тестируемых условий. *p < 0,01 (двусторонний дисперсионный анализ и апостериорный тест множественного сравнения Бонферрони). (С) результаты вестерн-блоттинга моноцитов, выделенных от двух независимых доноров, показывающие нестимулированные клетки (контроль) или клетки, стимулированные рекомбинантным человеческим IL-10 (hIL-10r), надосадочной жидкостью *M. pneumoniae* дикого типа (контроль дикого типа) или надосадочной жидкостью *M. pneumoniae*, экспрессирующих IL-10 (WT-IL-10).

Фигура 10: Схематические иллюстрации мутаций IL-10, созданных в этой работе для увеличения аффинности связывания рецепторов IL-10 R1 и R2. Подробности для каждого положения, измененного для улучшения взаимодействия с R1 или R2, показаны на отдельных панелях.

Фигура 11: Уровни экспрессии и кажущаяся константа диссоциации выбранных вариантов IL-10, экспрессируемых *M. pneumoniae* или с помощью *M. pneumoniae*. (А) Кажущаяся K_D (молярная) для ORF IL-10, MutM, hIL-10r, Mut1, Mut2, Mut3, MutSC1 и MutSC2. Среднее значение кажущейся K_D (пикомолярной) показано серым цветом сверху

каждого мутанта. $n > 3$ биологических повтора. *, $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ и апостериорный тест множественного сравнения Бонферрони, выбор в качестве эталонного состояния ORF IL-10). (B) Уровни экспрессии на фемтограммах (fg) IL-10, секретлируемого в среду, нормализованные по количеству бактериальных колониеобразующих единиц (КОЕ) через 48 часов после инокуляции (hpi). *, $p < 0,05$ (односторонний дисперсионный анализ + апостериорный критерий Тьюки). (C) Влияние состава линкера на функциональность белка MutSC1 и MutSC1_control Gly. На оси X показан диапазон анализируемой концентрации IL-10, а на оси Y — поглощение при 630 нм, измеренное в клетках HEK-blueTM (N = 3, n = 2). (D) Вестерн-блот активации p-STAT3 после индукции фиксированной концентрацией IL-10 (20 нг/мл) в двух разных клеточных линиях: THP-1 и HAFTL. Соотношение p-STAT3/STAT3 измеряли после 20 минут индукции и показано внизу графика. (E и F) Среднекратное изменение кажущегося K_D , определенное с помощью проточной цитометрии между ORF IL-10 и каждым из одноцепочечных мутантов MutSC1 и MutSC2, определенное в клетках BlaER1 (E) и HAFTL (F).

Фигура 12: Схематические иллюстрации, изображающие конструкцию одноцепочечных (SC) фолдикинов IL-10. (A) Стадии создания двух различных моделей объединения: (1) удаление краевых остатков; (2) схема перемонтажа; (3) структурная перестройка после перемонтажа соответствующих регионов; (4) окончательная нумерация в SC, включая числовые пробелы, достаточно длинные для размещения пептидных мостиков различной длины (до 20) во время поиска или связывания линкера. Номера остатков мономера 2 отмечены знаком ' на левой панели. (B) MutSC1 и MutSC2, построенные на основе 1-й модели объединения IL-10. Последовательности линкера показаны серыми метками; Мутации после перестройки включены для MutSC2 с использованием мономерной нумерации IL-10.

Фигура 13: Характеризация базового штамма *Mycoplasma pneumoniae* CV8 in vivo. Мышей C57Bl/6 инфицировали 10^7 КОЕ штаммов WT или CV8 и умерщвляли через 2 или 4 суток после заражения (dpi) ($n \geq 3$ на группу). (A) Аналогичные бактериальные нагрузки (Log10 КОЕ/легочный гомогенат) были обнаружены для штаммов WT (круг) и CV8 (квадрат) в анализируемые моменты времени. (B) Воспалительный профиль легких, инокулированных WT (средний столбец), CV8 (правый столбец) или PBS (левый столбец). Экспрессию генов анализировали с помощью RT-qPCR с использованием GAPDH в качестве эндогенного контроля (Методы). Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение изменения складки (FC) экспрессии мРНК (односторонний дисперсионный анализ + апостериорный тест Тьюки) (*, $p < 0,05$). (C) Гистологические

данные образцов легких. Слева графики представляют количественную оценку (оценка: 0–5) альвеолярного (верхняя панель) и перибронхиального/перибронхиолярного инфильтрата (нижняя панель). Параметры нормализовали с использованием среднего значения группы PBS (FC = значение образца / среднее значение PBS; контрольная группа FC, ~1). Данные представлены как среднее \pm SEM FC (односторонний дисперсионный анализ + апостериорный тест Тьюки) (*, $p < 0,05$). Справа показаны репрезентативные изображения легких, окрашенных гематоксилин-эозином (линия представляет собой 250 мкм). (D) Характеризация клеток, экспрессирующих WT и CV8. Продуцирование ORF IL-10 анализируемыми штаммами WT и CV8 измеряли с помощью ELISA и нормализовали по содержанию белка (биомасса). Функциональность вариантов IL-10, генерируемых штаммами WT или CV8, проверяли на клетках HEK-blueTM с использованием надосадочных жидкостей штамма WT или CV8 в качестве отрицательного контроля (односторонний дисперсионный анализ + апостериорный тест Тьюки) (*, $p < 0,05$).

Фигура 14: Иммуномодулирующие способности вариантов IL-10 *in vivo*. (A) Схематическое изображение мышинной модели. (B) КОЕ штаммов PAO1 (слева) или микоплазмы (справа), выделенных из образцов легких. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для Log₁₀ КОЕ/гомогената легких. (C) Кратное изменение (FC) экспрессии мРНК генов маркеров воспаления. Для нормализации значений использовали метод 2- $\Delta\Delta$ Ct с использованием Gapdh в качестве эндогенного контроля. Данные показаны как среднее \pm SEM FC. Статистический анализ проводили с использованием непарного t-критерия. (D) Значения P статистического сравнения группы PAO1+ PBS с неинфицированными животными или группами обработки PAO1+ с CV8, CV8, кодирующими IL-10 WT (CV8-IL-10 ORF), MutSC1 (CV8_MutSC1), MutSC2 (CV8_MutSC2) или человеческий рекомбинантный белок IL-10 (hIL-10r). Темно-серый = значительное увеличение; светло-серый = значительное снижение экспрессии генов. (E) Количественный анализ нейтрофильной эластазы (NE), показанный с помощью иммуногистохимии (ИГХ) образцов легких. Данные представлены как среднее \pm SEM процента положительных клеток, рассчитанное следующим образом: % = $100 \times$ (положительные клетки/положительные клетки + отрицательные клетки). (F) Показаны репрезентативные изображения ИГХ против NE. Ряды указывают NE-положительные клетки.

Фигура 15: Выравнивание множества последовательностей полипептидов IL-10 разных видов позвоночных, выполненное с помощью алгоритма ClustalX. IL-10 человека (SEQ ID NO: 349); IL-10 мыши (SEQ ID NO: 350); IL-10 макака (SEQ ID NO: 351); IL-10 курицы (SEQ ID NO: 352); IL-10 морской свинки (SEQ ID NO: 353) и IL-10 данио-рерио

(SEQ ID NO: 354).

Фигура 16: Наложение кристаллических структур IL-10, связанного с рецептором R1 (1yl6k), и IL-10, связанного как с рецепторами R1, так и с R2 (6x93). Относительно неструктурированная область, которая принимает другую конформационную структуру при взаимодействии с R2, показана внизу справа.

Фигура 17: Анализ инфицирования легких мышей *P. aeruginosa* PAO1. (A) Бактериальная нагрузка (КОЕ), полученная из гомогенатов легких мышей через 24 или 48 часов после инфицирования (hpi). (B) Кратное изменение экспрессии мРНК различных маркеров воспаления через 24 hpi с PAO1 в дозах 10^5 и 10^4 КОЕ/мышь.

Фигура 18: Создание контролей для обоснования дизайна белковой петли в фолдикине-10. (A) Активация клеток HEK-blue-10 с использованием надосадочной жидкости бактериальной клеточной культуры *Mycoplasma pneumoniae*. (B) Измерение Kdpp для фолдикина-10 (MutSC1) и двух контролей для демонстрации важности разработанных линкеров.

Фигура 19: График, показывающий влияние композиции линкера на фолдикин-22. Foldikine22_3 представляет собой фолдикин-22_3 (SCIL22_3), используемый в настоящей заявке, Foldikine22_controlcentre представляет собой фолдикин-22_3_centrallinkers, используемый в настоящей заявке, и Foldikine22_N-C loop polyG представляет собой Фолдикин-22_3_linkerNCpolygly, используемый в настоящей заявке. Демонстрация того, что замена спроектированных петель между N- и C-концами одного домена фолдикина, или в мостиках между доменами фолдикина, на полиG вызывает значительную потерю активности.

Фигура 20: Анализ влияния гидрофобных мутаций IL-22 по сравнению с IL22 wt.

Фигура 21: Анализ влияния отдельных мутаций гидрофобного ядра IL-22. IL-22 представляет собой IL-22 WT, C>A на концах представляет собой мутацию C в положении 7 на A; 56 — точечная мутация T56M в мономерном IL22; 66 представляет собой точечную мутацию A66M в мономерном IL22; 95 представляет собой точечную мутацию V95I в мономерном IL22; 99 представляет собой точечную мутацию T99F в мономерном IL22; 173 представляет собой точечную мутацию S173L в мономерном IL22. Внизу: кажущиеся средние значения K_D, определенные для дикого типа и мутантных конструкций.

Фигура 22: Графики, показывающие ответ клеток HEK-Blue™ IL-22 на модифицированные версии IL-22. Клетки HEK-Blue™ IL-22 инкубировали с надосадочной жидкостью бактерий, экспрессирующих либо IL-22, фолдикин-22_1, фолдикин-22_3, либо один из контролей с линкерами полиGly на N-C-концах (фолдикин-

22_3_linkerNCpolygly). После 24-часовой инкубации активацию внутренней передачи сигналов оценивали путем измерения уровней SEAP в надосадочной жидкости с использованием Quanti-Blue™. (А) неразбавленные надосадочные жидкости (концентрация > 30 нг/мл). (В) восемь последовательных разведений концентраций IL-22, начиная с 30 нг/л (каждое разведение 0,5X). По оси X концентрация отображается в молях.

Фигура 23: Ответ клеток HEK-Blue™ IL-10 и IL-22 на фолдикин-10/22 (SCIL10IL22). Клетки HEK-Blue™ IL-10 инкубировали с надосадочной жидкостью бактерий, экспрессирующих две разные химеры (Химера3 и Химера5). После 24-часовой инкубации активацию внутренней передачи сигналов оценивали путем измерения уровней SEAP в надосадочной жидкости с использованием Quanti-Blue™. Неразведенные надосадочные жидкости (концентрация количественно определяемой химеры > 30 нг/мл) оценивали на активность IL-10 и IL-22, соответственно.

Фигура 24: Ответ клеток HEK-Blue™ IL-10 и IL-22 на гетеродимеры, объединенные с короткими линкерами poly-Gly-ser. Клетки HEK-Blue™ IL-10 инкубировали с надосадочной жидкостью бактерий, экспрессирующих IL-10, IL-22, гетеродимер 10-22 (hetero1022) или гетеродимер 2210 (hetero2210). После 24-часовой инкубации активацию внутренней передачи сигналов оценивали путем измерения уровней SEAP в надосадочной жидкости с использованием Quanti-Blue™. Для панелей (А) и (В) неразведенные надосадочные жидкости (концентрация количественно определяемой химеры > 30 нг/мл) оценивали на содержание IL-10 и IL-22, соответственно.

Фигура 25: Схематическая иллюстрация схемы мутаций для образования фолдикина на основе димерного цитокина класса I с обменяемым доменом: (i) димер дикого типа с обменяемым доменом, показывающий α -спираль D каждой мономерной единицы, выравнивающуюся с противоположными α -спиралями A, B и C мономера для образования соседних 3D-доменов, содержащих α -спирали A, B и C последовательности первого мономера и α -спираль D последовательности второго мономера; (ii) одноцепочечный фолдикин на основе объединенных мономеров дикого типа, в котором последовательности мономеров соединяются с образованием одноцепочечного полипептида путем связывания C-конца последовательности одного мономера с N-концом последовательности второго мономера с использованием пептидного линкера (пунктир). Линкеры дикого типа показаны сплошными линиями. Прямоугольниками обозначены α -спирали, образующие каждый из левого и правого 3D-доменов. Как показано, существует два пептидных линкера, охватывающих третичные структуры первого (слева) и второго (справа) 3D-доменов для обеспечения структурной/конформационной стабильности.

Фигура 26: Схематическая иллюстрация схемы мутаций для образования фолдикина на основе димерного цитокина класса I: (i) димер дикого типа, показывающий левый и правый домены димера цитокина, каждый из которых содержит α -спирали A, B, C и D последовательностей первого и второго мономера, соответственно; (ii) одноцепочечный фолдикин на основе объединенных мономеров дикого типа, в котором последовательности мономеров соединены с образованием одноцепочечного полипептида путем связывания C-конца каждого мономера с соответствующим N-концом каждого мономера (пунктирная линия), с последующим удалением внутреннего линкера дикого типа из одной из исходных последовательностей мономера для создания новых N- и C-концов. Линкеры дикого типа показаны сплошными линиями. Прямоугольниками обозначены α -спирали, образующие каждый из левого и правого 3D-доменов. Как показано, существует два пептидных линкера, охватывающих третичные структуры первого (слева) и второго (справа) 3D-доменов для обеспечения структурной/конформационной стабильности.

Фигура 27: Схематическая иллюстрация схемы мутаций для образования фолдикина на основе димерного цитокина класса II: (i) димер дикого типа, показывающий левый и правый домены димера цитокина, каждый из которых содержит α -спирали A, B, C, D, E, F и G последовательностей первого и второго мономера, соответственно; (ii) одноцепочечный фолдикин на основе объединенных мономеров дикого типа, в котором последовательности мономеров соединяются с образованием одноцепочечного полипептида путем связывания C-конца одного мономера с N-концом того же мономера и удаления внутреннего линкера дикого типа из каждой исходной последовательности мономера для создания новых N- и C-концов, которые затем соединяются двумя новыми междоменными пептидными линкерами (пунктирные линии) с образованием одноцепочечного полипептида. Линкеры дикого типа показаны сплошными линиями. Прямоугольниками обозначены α -спирали, образующие каждый из левого и правого 3D-доменов. Как показано, существует два пептидных линкера, охватывающих третичные структуры первого (слева) и второго (справа) 3D-доменов для обеспечения структурной/конформационной стабильности.

Фигура 28: Схематическая иллюстрация схемы мутаций для образования фолдикина на основе димерного цитокина класса II с обмениваемым доменом: (i) димер дикого типа с обмениваемым доменом, показывающий α -спирали D, E и F каждой мономерной единицы, которые выравнены с противоположными α -спиралями A, B и C мономера для образования соседних 3D-доменов, содержащих α -спирали A, B и C последовательности первого мономера и α -спирали D, E и F последовательности второго

мономера; (ii) одноцепочечный фолдикин на основе объединенных мономеров дикого типа, в котором последовательности мономеров соединяются с образованием одноцепочечного полипептида путем связывания С-конца последовательности одного мономера с N-концом последовательности второго мономера с использованием пептидного линкера. (пунктир). Линкеры дикого типа показаны сплошными линиями. Прямоугольниками обозначены α -спирали, образующие каждый из левого и правого 3D-доменов. Как показано, существует два пептидных линкера, охватывающих третичные структуры первого (слева) и второго (справа) 3D-доменов для обеспечения структурной/конформационной стабильности.

Фигура 29: График, демонстрирующий экспрессию фолдикина MutSC1 в клетках *E. coli*. Полипептидную последовательность IL-10 в IL-10 дикого типа и в фолдине MutSC1 количественно определяли с помощью ELISA как из осажденных клеток (pell), так и из надосадочной жидкости (sup). Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) нормализовали по fg IL-10, оцененному в каждой культуре. Экспрессию MutSC1 детектировали как в осадке, так и в надосадочной жидкости. Функциональность MutSC1, экспрессируемого *E. coli*, оценивали в клетках HEK-blue. MutSC1 как в осадке, так и в надосадочной жидкости активировал каскад p-STAT3 в этой репортерной клеточной линии. MutSC1_His показывает результаты для фолдикина, меченного His.

Фигура 30: График, демонстрирующий экспрессию фолдикина MutSC1 в клетках *L. lactis*. Полипептидную последовательность IL-10 в IL-10 дикого типа и MutSC1 определяли количественно с помощью ELISA как из осажденных клеток (pell), так и из надосадочной жидкости (sp). Функциональность белков, экспрессируемых *L. Lactis*, проверяли с использованием репортерных клеток HEK-Blue10. По оси y fg определяли количественно с помощью ELISA и нормализовали по КОЕ, подсчитанным в двух разных культурах, IL-10 и MutSC1.

Фигура 31: Схематическая иллюстрация схемы мутаций для образования фолдикина согласно способу А на основе цитокина(ов) класса I. (Верхняя часть) мономеры цитокинов типа I дикого типа, каждый из которых содержит α -спирали A, B, C и D; (Нижняя часть) одноцепочечный фолдикин на основе объединенных мономеров дикого типа, в котором последовательности мономеров соединяются путем размыкания петли между α -спиралями B и C обоих мономеров цитокина, связывая новый N-конец одного мономера цитокина с новым С-концом другого мономера цитокина, и наоборот, и связывая природный N-конец и С-конец одного мономера цитокина. Линкеры дикого типа показаны сплошными линиями. Прямоугольниками обозначены α -спирали, образующие каждый из левого и правого 3D-доменов. Как показано, существует два пептидных

линкера, охватывающих третичные структуры первого (слева) и второго (справа) 3D-доменов для обеспечения структурной/конформационной стабильности.

Фигура 32: 3D-изображение Фолдикина, фолдикина согласно способу А, на основе димерного цитокина класса I с вновь введенными интерлинкерами, показанными черным, (линкеры между двумя мономерами цитокина), а также новым интралинкером (соединяющим природный N-конец и C-конец одного из мономеров цитокина). Nt и Ct обозначают N- и C-концы исходного мономера цитокина.

Фигура 33: Схематическая иллюстрация схемы мутаций для образования фолдикина согласно Пути В на основе двух цитокинов класса II: (Верхняя часть) мономеры цитокинов дикого типа типа II, каждый из которых содержит α -спирали А, В, С, D, Е, F. и G последовательностей первого и второго мономеров, соответственно; (Нижняя часть) одноцепочечный фолдикин на основе объединенных мономеров дикого типа, в которых последовательности мономеров соединяются с образованием одноцепочечного полипептида путем связывания С-конца одного мономера с N-концом другого мономера и наоборот, и путем удаления внутреннего линкера дикого типа между α -спиралями С и D из исходной последовательности одного мономера для создания новых N- и C-концов (Nt и Ct) с образованием одноцепочечного полипептида. Линкеры дикого типа показаны сплошными линиями. Прямоугольниками обозначены α -спирали, образующие каждый из левого и правого 3D-доменов. Как показано, существует два пептидных линкера, охватывающих третичные структуры первого (слева) и второго (справа) 3D-доменов для обеспечения структурной/конформационной стабильности.

Фигура 34: 3D-изображение фолдикина согласно способу А на основе димерного цитокина класса II: прерывистыми черными линиями показаны вновь введенные интерлинкеры, а новые Nter и новый Cter обозначают вновь созданные N- и C-концы после размыкания петли в одном мономере.

Фигура 35: График титрования клеток НЕК BlueTM, отвечающих на IL-2, с надосадочной жидкостью клеток CHO, транзиторно экспрессирующих IL-2 WT и фолдикины IL-2 (SCIL2 имеет разные интерлинкеры, состоящие из пролина (ORK2_6–8) или глицина/серина (ORK_9–11)). Белки экспрессировали с использованием CHO в качестве системы экспрессии. Vmax приняли равным 0,9.

Фигура 36: График титрования клеток НЕК BlueTM, отвечающих на IL-22, с надосадочной жидкостью клеток *M. pneumoniae*, транзиторно экспрессирующих IL-22 WT или фолдикины IL-22 (ORK22 имеет различные интерлинкеры, состоящие из пролина (ORK17–19) или глицина/серина (ORK_24–19) 26)).

Фигура 37: График титрования клеток НЕК BlueTM, отвечающих на IL22, с

надосадочной жидкостью клеток CHO, транзиторно экспрессирующих IL-22 WT (9,76E-11 M) и фолдикины IL-22 (ORIK22-12 (4,32E-11M) с интерлинкерами polypro и ORIK22_14 (2,41E-09M) с интерлинкерами polyGly). Белки экспрессировали с использованием CHO в качестве системы экспрессии.

Фигура 38: График титрования клеток HEK Blue™, отвечающих на IL-2, с надосадочной жидкостью клеток CHO, транзиторно экспрессирующих IL-2 WT и химерный фолдикин IL2/IL-4 (линкер IL2-IL4 PolyPro).

Фигура 39: График титрования клеток HEK Blue™, отвечающих на IL-4, с надосадочной жидкостью клеток CHO, транзиторно экспрессирующих IL-2 WT и химерный фолдикин IL2/IL-4 (линкер IL2-IL4 PolyPro). Для сравнительной цели нами показана активность коммерчески приобретенного IL-4 (6507-IL-010/CF, Biotechne).

Фигура 40: График титрования клеток HEK Blue™, отвечающих на IL-2, с надосадочной жидкостью клеток CHO, транзиторно экспрессирующих IL-2 WT и фолдикин ORK2_013.

Фигура 41: График титрования клеток HEK Blue™, отвечающих на IL-22. По оси Y нами показано рассчитанное EC-50 в нМ. На оси X указаны различные варианты IL, экспрессированные в CHO и протестированные. Во всех случаях нами показаны для сравнения значения для IL-22 WT. Различные варианты представляют собой разные версии кольцевого перестановочного элемента цитокинов WT, в которых нами соединены Nt и Ct с помощью сконструированного с использованием программы белкового дизайна (ModelX и FoldX) линкера, и раскрывающиеся в различные петли. LF означает, что белок экспрессируется, но потерял активность в репортерных клетках HEK. Белки экспрессировали с использованием CHO в качестве системы экспрессии. Вверху каждого столбца отображается среднее значение EC-50 в нМ для каждого варианта.

Фигура 42: График титрования клеток HEK Blue™, отвечающих на IFN β . На оси X указаны различные варианты IL, экспрессированные в CHO и протестированные. Во всех случаях нами показаны для сравнения значения WT IFN β . Различные варианты представляют собой разные версии кольцевого перестановочного элемента для цитокинов дикого типа, в которых Nt и Ct соединены нами с помощью линкера, сконструированного с использованием программы белкового дизайна (ModelX и FoldX), и разомкнутые в различных петлях. Белки экспрессировали с использованием CHO в качестве системы экспрессии. Вверху каждого столбца отображается среднее значение EC-50 в нМ для каждого варианта.

Фигура 43: График титрования клеток HEK Blue™, отвечающих на IL-2. На оси X указаны различные варианты IL, экспрессированные в CHO и протестированные. Во

всех случаях нами показаны для сравнения значения для IL-2 WT. Различные варианты представляют собой разные версии кольцевого перестановочного элемента для цитокинов дикого типа, в которых Nt и Ct соединены нами с помощью линкера, сконструированного с использованием программы белкового дизайна (ModelX и FoldX), и разомкнутые в различных петлях. Белки экспрессировали с использованием СНО в качестве системы экспрессии. Вверху каждого столбца отображается среднее значение EC-50 в нМ для каждого варианта.

Фигура 44: График титрования клеток НЕК Dual, отвечающих на IFN γ , с помощью надосадочной жидкости клеток СНО, транзиторно экспрессирующих IFN γ WT, и фолдикин ORKIFNg-002.

Фигура 45: Схематическая иллюстрация схемы мутаций для образования фолдикина согласно способу С на основе димерного(ых) цитокина(ов) класса I. (Верхняя часть) мономеры дикого типа типа I (цитокин 1 и цитокин 2), каждый из которых содержит α -спирали A, B, C и D; (Нижняя часть) одноцепочечный фолдикин на основе объединенных мономеров дикого типа, в котором последовательности мономеров соединяются путем размыкания петли между α -спиралями B и C мономеров обоих цитокинов. Петля, разомкнутая между спиралями B и C мономера 2, разомкнута, спираль B мономера 2 связана с природным N-концом мономера 1, а спираль C связана с природным C-концом мономера 1. Прямоугольниками обозначены α -спирали, образующие каждый из левого и правого 3D-доменов. Как показано, существует два пептидных линкера, охватывающих третичные структуры первого (слева) и второго (справа) 3D-доменов для обеспечения структурной/конформационной стабильности.

Фигура 46: 3D-изображение Фолдикина в соответствии со способом С на основе димерного цитокина класса I с вновь введенными интерлинкерами (линкеры между двумя мономерами цитокинов), показанными пунктирными линиями. N-t и C-t обозначают N- и C-концы исходного мономера цитокина.

Фигура 47: Схематическая иллюстрация схемы мутаций для образования фолдикина согласно способу С на основе цитокина(ов) класса II. (верхняя часть) мономеры типа II дикого типа (цитокины 1 и 2), каждый из которых содержит α -спирали A, B, C, D, E, F и G; (нижняя часть) одноцепочечный фолдикин на основе объединенных мономеров цитокина типа II дикого типа, в котором последовательности мономеров соединяются путем размыкания петли между α -спиралями B и C мономера одного цитокина (цитокина 1), связывания нового C-конца (Цитокин 1, спираль B) разомкнутого мономера цитокина с природным N-концом мономера другого цитокина (цитокин 2, спираль A) и связывания нового N-конца (цитокин 1, спираль C) разомкнутого мономера

цитокина с природным С-концом мономера другого цитокина (цитокина 2; спираль F). Прямоугольниками обозначены α -спирали, образующие каждый из левого и правого 3D-доменов. Как показано, существует два пептидных линкера, охватывающих третичные структуры первого (слева) и второго (справа) 3D-доменов для обеспечения структурной/конформационной стабильности.

Фигура 48: 3D-изображение Фолдикина согласно способу С на основе димерного цитокина класса II с вновь введенными интерлинкерами (линкеры между двумя мономерами цитокинов), показанными жирными линиями. N-t и C-t обозначают N- и С-концы исходного мономера цитокина.

Подробное описание изобретения

Все источники, процитированные в настоящей заявке, включены ссылкой в полном объеме. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение (например, в области клеточных культур, молекулярной генетики, химии нуклеиновых кислот и биохимии).

Если не указано иное, при практическом осуществлении настоящего изобретения используются традиционные методы химии, молекулярной биологии, микробиологии, технологии рекомбинантной ДНК, химические методы, фармацевтические составы, а также доставка и обработка животных, которые находятся в пределах возможностей обычного специалиста в области техники. Такие методы также описаны в литературе, например, J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 и periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridisation: Principles and Practice*, Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; and D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press. Каждый из этих общих текстов включен сюда ссылкой.

Чтобы облегчить понимание изобретения, в настоящей заявке определены несколько терминов.

Термин «аминокислота» в контексте настоящего изобретения используется в самом широком смысле и подразумевает включение встречающихся в природе $L\alpha$ -аминокислот или остатков. В данной заявке применяются обычно используемые одно- и трехбуквенные

сокращения для встречающихся в природе аминокислот: A=Ala; C=Cys; D=Asp; E=Glu; F=Phe; G=Gly; H=His; I=Ile; K=Lys; L=Leu; M=Met; N=Asn; P=Pro; Q=Gln; R=Arg; S=Ser; T=Thr; V=Val; W=Trp; и Y=Tyr (Lehninger, A. L., (1975) *Biochemistry*, 2d ed., pp. 71-92, Worth Publishers, New York). Общий термин «аминокислота» далее включает D-аминокислоты, ретро-инверсо-аминокислоты, а также химически модифицированные аминокислоты, такие как аналоги аминокислот, встречающиеся в природе аминокислоты, которые обычно не включаются в белки, такие как норлейцин, и химически синтезированные соединения, обладающие свойствами, известными в данной области техники как характерные для аминокислоты, такие как β -аминокислоты. Например, в определение аминокислоты включены аналоги или миметики фенилаланина или пролина, которые допускают такое же конформационное ограничение пептидных соединений, как и природные Phe или Pro. Такие аналоги и миметики называются в настоящей заявке «функциональными эквивалентами» соответствующей аминокислоты. Другие примеры аминокислот перечислены в Roberts and Vellaccio, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Gross and Meiehofer, eds., Vol. 5 p. 341, Academic Press, Inc., N.Y. 1983, которая включена в настоящий документ ссылкой.

Термин «пептид», используемый в настоящей заявке (например, в контексте белка фолдикина, раскрытого в настоящей заявке), относится к множеству аминокислот, соединенных вместе в линейную или замкнутую цепь. Термин олигопептид обычно используется для описания пептидов, содержащих от 2 до около 50 или более аминокислот. Пептиды, содержащие более 50 аминокислот, часто называют полипептидами или белками. Однако для целей настоящего изобретения термин «пептид» не ограничивается каким-либо конкретным количеством аминокислот и используется взаимозаменяемо с терминами «полипептид» и «белок», если не указано иное. Принимая во внимание, что незначительные модификации первичной последовательности пептидов/белков по настоящему изобретению могут быть сделаны без существенного изменения активности полипептидов по настоящему изобретению, следует считать, что настоящее раскрытие и различные аспекты и воплощения изобретения охватывают, кроме того, любые полипептидные последовательности, которые по существу совпадают со специфическими аминокислотными последовательностями, описанными в настоящей заявке. Например, заявленное изобретение охватывает полипептидные последовательности, которые имеют по меньшей мере 80% идентичности с полипептидами, раскрытыми в настоящей заявке (такими, которые могут быть определены SEQ ID NO полипептидных последовательностей, раскрытых в настоящей заявке), по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по

меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности, по меньшей мере 99% идентичности или приблизительно 100% идентичности с полипептидными последовательностями SEQ ID NO, явно раскрытым в настоящей заявке.

В настоящем документе термин «цитокин» относится к любому из широкой и слишком общей категории небольших белков, важных для передачи сигналов в клетках. Цитокины представляют собой пептиды, которые не могут проникнуть через липидный бислой клеток и попасть в цитоплазму. Было показано, что цитокины участвуют в аутокринной, паракринной и эндокринной передаче сигналов в качестве иммуномодулирующих агентов. Термин «фолдикин», используемый в настоящей заявке, относится к одноцепочечному цитокину, который получен из двух мономеров цитокина дикого типа, которые ковалентно связываются и складываются с образованием димерной структуры с 3D-доменами. В общем, пептидная последовательность каждого 3D-домена ковалентного димера также не существует в природе, поскольку она включает одну или более аминокислотных мутаций, замен и/или делеций с целью (i) димеризации мономеров цитокина; и/или (ii) структурного ограничения конфигурации новой 3D-димерной единицы.

Термины «нуклеиновая кислота», «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» используются взаимозаменяемо и относятся к полимеру дезоксирибонуклеотида (ДНК) или рибонуклеотида (РНК) в линейной или замкнутой конформации, а также в одно- или двухцепочечной форме или к смешанным полимерам. Для целей настоящего изобретения такие полимеры ДНК или РНК могут включать природные нуклеотиды, неприродные или синтетические нуклеотиды и их смеси. Неприродные нуклеотиды могут включать аналоги природных нуклеотидов, а также нуклеотиды, которые модифицированы по основанию, сахару и/или фосфату (например, фосфотиоатные каркасы). Примерами модифицированных нуклеиновых кислот являются ПНК и морфолинонуклеиновые кислоты. Как правило, аналог конкретного нуклеотида имеет такую же специфичность спаривания оснований, т.е. аналог G будет спариваться с C. Для целей изобретения эти термины не следует рассматривать как ограничивающие длину полимера. В некоторых воплощениях 5'- и/или 3'-конец полинуклеотидов по настоящему изобретению можно модифицировать для улучшения стабильности последовательности и активного предотвращения деградации. Подходящие модификации в этом контексте включают, без ограничения указанным, биотинилированные нуклеотиды и фосфотиоатные нуклеотиды.

«Ген», используемый в настоящей заявке, представляет собой сегмент нуклеиновой кислоты (обычно ДНК), который участвует в получении полипептидного или

рибонуклеинового генного продукта. Он включает области, предшествующие и следующие за кодирующей областью (лидерную и хвостовую), а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами). Удобно, что этот термин также включает необходимые контрольные последовательности для экспрессии генов (например, энхансеры, сайленсеры, промоторы, терминаторы и т. д.), которые могут быть соседними или удаленными от соответствующей кодирующей последовательности, а также кодирующие и/или транскрибируемые области, кодирующие генный продукт. Предпочтительными генами в соответствии с настоящим изобретением являются те, которые кодируют цитокины, и особенно те, которые кодируют димерные цитокины или «фолдикины» согласно настоящему раскрытию. Принимая во внимание избыточность кодонов, настоящее описание и заявленное изобретение охватывают полинуклеотидные последовательности, которые имеют по меньшей мере 70% идентичности с полинуклеотидами, раскрытыми в настоящей заявке, такими как SEQ ID NO, раскрытые в настоящей заявке; по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности, по меньшей мере 99% идентичности или приблизительно 100% идентичности с полинуклеотидными последовательностями, кодирующими SEQ ID NO, явно раскрытым в настоящей заявке.

В контексте настоящего изобретения термины «индивидуум», «субъект» или «пациент» используются взаимозаменяемо для обозначения животного, которое может страдать от медицинского (патологического) состояния и может реагировать на обработку терапевтической молекулой или лекарственным средством по изобретению. Подходящим животным, подлежащим лечению, является млекопитающее, такое как человек, примат, не являющийся человеком, корова, овца, свинья, собака, кошка, кролик, мышь или крыса. Предпочтительно субъектом является человек.

Термины «лечить», «лечение» или «терапия», используемые в настоящей заявке в контексте болезненного состояния или состояния, относятся к уменьшению тяжести и/или частоты одного или более патогенных симптомов, устранению симптомов и/или предотвращению симптомов и/или основной причины или причин такого заболевания или состояния. В некоторых случаях такое лечение может относиться к уменьшению или улучшению физиологического повреждения, вызванного заболеванием или состоянием.

Концепция фолдикина

Повышение эффективности цитокинов, таким образом, снижение концентрации, необходимой для терапевтического эффекта, может быть достигнуто за счет улучшения их сворачиваемости или уменьшения скорости их деградации и клиренса из сыворотки.

Это требует сконструированных мутаций, которые улучшат аффинность связывания, уменьшат агрегацию или соединят их с другими белковыми доменами, такими как Fc (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32994996/>), или подвергнут их химической модификации (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32994996/>).

<https://www.nature.com/articles/s41551-021-00797-8>; <https://www.mdpi.com/2079-4991/9/8/1074>; <https://link.springer.com/article/10.1007/s11912-019-0760-z>). Что касается снижения токсичности, то во многих случаях это происходит потому, что конкретный цитокин связывается с различными клетками организма, некоторые из которых являются желаемой мишенью, а другие оказывают нежелательное воздействие. Большинство цитокинов связываются двумя или тремя различными рецепторами, некоторые из них являются неизбирательными и распознают более одного цитокина. Рецепторы для конкретного цитокина не экспрессируются пропорционально на одном и том же уровне во всех клетках, и поэтому должна быть возможность изменить аффинность к одному рецептору, чтобы способствовать связыванию с определенной группой клеток и, следовательно, снизить токсичность (<https://doi.org/10.1111/all.15132> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33737461/>).

В некоторых случаях комбинация двух разных цитокинов может быть полезна для конкретных методов лечения, причем оба цитокина могут быть антагонистами или агонистами или комбинация представляет собой смесь обоих цитокинов (<https://academic.oup.com/abt/article/4/2/123/6309385>). Соединение двух цитокинов путем вставки линкерной последовательности между N-концом одной молекулы и C-концом другой может быть одним из способов решения части или всех вышеперечисленных проблем. Однако не всегда возможно связать два цитокина через их N- или C-конец – даже если такие цитокины действуют путем образования нековалентных димеров – из-за несовместимости способа связывания с их рецепторами. Кроме того, гибкий линкер будет подвержен протеолизу и может не увеличивать аффинность связывания из-за конформационной гибкости между двумя мономерами.

Концепция в настоящей заявке фолдикина может обеспечить значительные преимущества как перед цитокинами дикого типа, так и перед цитокинами предшествующего уровня техники. Как отмечалось выше, фолдикин представляет собой молекулу, состоящую из двух модифицированных цитокиновых доменов, каждый из которых в настоящей заявке называется «доменом фолдикина»; и в этом отношении следует отметить, что по меньшей мере один из двух «доменов фолдикина» не является структурно или последовательно таким же, как домен мономера цитокина, на основе которого образуется домен фолдикина, как будет описано в настоящей заявке. В аспектах

и воплощениях фолдикинов по изобретению можно считать, что один из двух доменов фолдикинов является непрерывным по последовательности. Этот домен фолдикина может иметь неприродный порядок последовательности по сравнению с соответствующим мономером/доменом цитокина, в то время как другой домен фолдикина расщепляется на две части одинакового или разного размера, соединенные с природными или вновь созданными N- и C-концами непрерывного домена фолдикина (см. Фигуру 1). Непрерывные и расщепленные домены фолдикина также можно называть в настоящей заявке 3D-доменами.

Таким образом, предлагается полипептид одноцепочечного димерного цитокина, содержащий: (а) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (б) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где последовательность одного из доменов мономера цитокина или его функциональной части не является непрерывной и прерывается последовательностью другого домена мономера цитокина или его функциональной части.

Домен мономера цитокина одноцепочечного полипептида димера цитокина, последовательность которого не является непрерывной, представляет собой домен мономера цитокина, который содержит свободный N-конец сконструированного одноцепочечного полипептида димера цитокина. Этот домен мономера цитокина состоит или является частью так называемого «расщепленного домена» в настоящей заявке.

Последовательность другого домена мономера цитокина или его функциональной части может иметь свой природный порядок последовательности или другой. Второй домен мономера цитокина также называется «непрерывным доменом» в настоящей заявке; он соединен с расщепленным доменом двумя пептидными линкерами («интерлинкерами»).

Преимущества фолдикинов

Наличие двух функциональных независимых доменов с фиксированной ориентацией внутри одной и той же молекулы открывает несколько интересных возможностей, которые являются ответом на некоторые из упомянутых выше проблем и не зависят от способа производства и введения (см. Фигуру 2).

В воплощениях, как показано, например, на Фигурах 3–6, 25–28, 31–34 и 45–48 фолдикины имеют преимущество наличия двух линкеров между соседними (левым и правым) 3D-доменами (которые сами по себе можно считать «непрерывными» и «расщепленными»), что может повысить структурную/конформационную стабильность свернутого димера и привести к улучшению связывания с его рецепторами-мишенями, поскольку энтропийные затраты на связывание будут в основном лежать на первом 3D-

домене, и поскольку существование двух линкеров ограничивает подвижность второго 3D-домена. Кроме того, предоставление двух независимых 3D-доменов, соединенных двумя линкерами, позволяет создавать гомо- или гетеродимерные цитокины с новыми свойствами и дает больше свободы мутациям, которые могут быть введены на поверхность 3D-доменов, например которые взаимодействуют с рецепторами, что может обеспечить большую селективность к определенному типу клеток в зависимости от уровня экспрессии рецепторов-мишеней.

В некоторых преимущественных воплощениях гетеродимерный фолдикин согласно изобретению может демонстрировать улучшенное связывание одного домена с его рецептором-мишенью, но пониженное связывание другого домена с его рецептором-мишенью. В таких воплощениях первый домен можно преимущественно использовать для нацеливания на конкретные клетки; хотя, поскольку второй домен будет иметь пониженную аффинность, он может выгодно связываться только/в первую очередь только с теми клетками, которые также экспрессируют рецепторы для первого домена. В некоторых воплощениях фолдикины могут также увеличивать аффинность связывания обоих доменов, тем самым значительно снижая эффективную физиологическую концентрацию, которая может быть необходима для достижения конкретного физиологического эффекта. Например, может быть желательно сконструировать молекулу-антагонист, имеющую два домена с высокой аффинностью к одному рецептору и ни одного - ко второму рецептору (соответствующего цитокина дикого типа), так чтобы фолдикин мог эффективно конкурировать с соответствующими мономерными физиологическими цитокинами. Наличие двух 3D-доменов допускает множество возможных комбинаций хоминга, аффинности и специфичности, а также объединение функций агониста и антагониста в одной молекуле.

Дизайн фолдикинов на основе семейств цитокинов

Мы разработали концепцию фолдикина для цитокинов, состоящих из пучка спиралей, которые составляют большинство интерлейкинов, но предполагается, что можно будет применить аналогичный подход к другим белкам, имеющим структуры пучков спиралей, или для цитокинов с другими укладками. Интерлейкины, состоящие из пучков спиралей, классифицируются следующим образом:

(А) Спиральные цитокины класса I, которые можно подразделить на цитокины с длинноцепочечными спиральями (IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTGF, LIF, OSM и CSF3) или цитокины с короткоцепочечными спиральями (IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, IL13, IL15, IL21, TSLP, GM-CSF, CSF1 и CSF2); или

(В) Цитокины класса II представляют собой IL10-подобные белки, включая (IL10,

IL19, IL20, IL22, IL24, IL26, IL28A, IL28B и IL29), а также интерфероны типа I, такие как IFN α (IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6), IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17 и IFNA21), IFN ω (IFNW1), IFN ϵ (IFNE), IFN κ (IFNK) и IFN β (IFNB1).

Хотя большинство цитокинов, состоящих из пучка спиралей, имеют схожие мономерные структуры в каждом классе, цитокины типа I обычно включают 4 консервативные α -спирали, тогда как цитокины типа II обычно включают 6 консервативных α -спиралей, IFN γ , IL-5 и IL-10 представляют собой димерные белки с «обмениваемым доменом». В димерном белке с обмениваемым доменом, таком как IL-10, мономерная структура стандартных цитокинов, состоящих из пучка спиралей, размыкается и охватывается антипараллельным образом другим разомкнутым мономером IL-10, образуя два функциональных расщепленных цитокиновых домена, определяющих два соседних 3D-домена (см., например, Фигуры 3 и 25).

В зависимости от класса интерлейкина и того, является ли интерлейкин мономерным или димером с обмениваемым доменом, можно использовать различные стратегии создания фолдикинов, как описано в настоящей заявке.

В настоящем документе α -спирали мономера цитокина пронумерованы в алфавитном порядке A, B, C и D (для цитокинов класса I) или A, B, C, D, E и F (для цитокинов класса II), или по порядковому номеру (с первого по четвертый или шестой, в зависимости от класса цитокина), от N-конца к C-концу.

Фолдикины, содержащие цитокины с обмениваемым доменом

Согласно этому воплощению полипептид одноцепочечного димерного цитокина согласно изобретению содержит первый и/или второй мономер (мономеры) цитокина формирующие димеры с обмениваемым доменом.

Согласно одному воплощению полипептид одноцепочечного димерного цитокина согласно изобретению содержит первый и второй мономеры цитокина, которые образуют димеры с обмениваемым доменом. В частности, первый и второй мономеры цитокина, которые образуют димеры с обмениваемым доменом, могут происходить из одного и того же цитокина или из двух разных цитокинов (два разных цитокина класса I или два разных цитокина класса II).

В случае цитокинов с обмениваемым доменом (например, IFN γ , IL-5 и IL-10) схема конструирования одноцепочечного димерного цитокина по раскрытию (т.е. фолдикина) может зависеть от того, должен ли цитокин с обмениваемым доменом быть объединен со вторым цитокином с обмениваемым доменом или с цитокином, который не образует обмениваемый домен.

Как описано со ссылкой, например, на Фигурах 3, 25 и 28 в воплощениях, в

которых оба мономера, из которых создается фолдкин, из природных димеров с обмениваемым доменом, процесс может включать связывание N-конца первого мономера цитокина с C-концом второго мономера цитокина, так что в димере фолдкина с обмениваемым доменом образуется «непрерывный 3D-домен (фолдкин)» (правый домен на Фигуре 3) и формируется расщепленный 3D-домен (фолдкин) (левый домен на Фигуре 3). В этом случае, однако, отмечается, что «непрерывный» 3D-домен имеет спираль/последовательность, инвертированную по сравнению с цитокином дикого типа, поскольку C-концевая спираль большинства N-концевых мономеров связана с N-концевой спиралью самого C-концевого мономера (Фигуры 25 и 28). Кроме того, следует отметить, что каждый домен в 3D-пространстве состоит из частей двух отдельных полипептидных мономеров.

В любых таких аспектах и воплощениях линкерная последовательность, соединяющая C-конец одного мономера и N-конец другого мономера, может иметь любую подходящую последовательность; и предпочтительно содержит последовательность, которая определяет конформационно ограниченную структуру, т.е. «структурированный» линкер. Таким образом, сконструированные линкеры помогают конформационно удерживать доменные 3D-структуры в подходящей/желаемой структурной ориентации. Такие линкеры могут иметь от около 3 до около 20 аминокислотных остатков; от около 3 до около 16 аминокислотных остатков; от около 4 до около 12 аминокислотных остатков, от около 4 до около 8 аминокислотных остатков, от около 3 до около 8 аминокислотных остатков или от около 3 до 6 аминокислотных остатков. Преимущество таких линкеров состоит в том, что они не содержат множества остатков Gly и/или Ser, расположенных рядом друг с другом; например, предпочтительно, чтобы линкерный пептид содержал 5 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; предпочтительно 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; 2 или менее остатков Gly и/или Ser; содержал только выделенные остатки Gly и/или Ser; или в некоторых воплощениях не содержал остатков Gly и/или Ser.

Соответственно, предлагается полипептид одноцепочечного димерного цитокина, который содержит первый мономер цитокина и второй мономер цитокина, которые образуют димеры с обмениваемым доменом, где линкерный пептид соединяет N-конец первого мономера цитокина с C-концом второго мономера цитокина.

В некоторых воплощениях мономеры цитокина, образующие димеры с обмениваемым доменом, представляют собой цитокины класса I, и указанный полипептид одноцепочечного димерного цитокина содержит, от N-конца к C-концу, первый домен мономера цитокина, который содержит спирали A-C второго мономера цитокина и спираль

D первого мономера цитокина (см., например, «расщепленный домен» на Фигуре 25), а также второй домен мономера цитокина, который включает спираль D второго мономера цитокина и спирали А-С первого мономера цитокина (см. например, «непрерывный домен» на Фигуре 25), где линкерный пептид соединяет спираль D второго мономера цитокина со спиралью А первого мономера цитокина.

Примерные гомомерные фолдикины на основе цитокина класса I с обменяемым доменом включают димерный IL-5, который содержит или состоит из:

```

TEIPTSALVKETLALLSTHRTLLIANETLRIPVPVHKNHQLCTEEIFQIGTLESQTVQGGTVERLFFK
  hhhhhhhhhhhhhhh  hhhh  hhhhhhhhhhh  hhhhhh
                HA                HB
NLSLIKKYIDGQKKKCGEERRRVNQFLDYLOEFLGVMNTEWIIIES (NtCt)
  hhhhhhhhhhhhhhh  hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                HC                HD
TEIPTSALVKETLALLSTHRTLLIANETLRIPVPVHKNHQLCTEEIFQIGTLESQTVQGGTVERLFFKNL
  hhhhhhhhhhhhhhh  hhhh  hhh  hhhhhhhhhhh  hhhhhhhh
                HA                HB                HC
SLIKKYIDGQKKKCGEERRRVNQFLDYLOEFLGVMNTEWIIIES
  hhhhhhhhhhhhh  hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                HD

```

где (NtCt) представляет собой пептидный линкер (последовательность SEQ ID NO: 101-(NtCt)-SEQ ID NO: 102) или последовательность, идентичную ему по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%, и сохраняющую по меньшей мере ту же стабильность и/или, по меньшей мере, тот же уровень взаимодействия с рецептором IL-5.

Положения спиралей представлены строками «h» в приведенной выше последовательности.

В некоторых воплощениях мономеры цитокина, образующие димеры с обменяемым доменом, представляют собой цитокины класса II, и указанный полипептид одноцепочечного димерного цитокина содержит от N-конца к C-концу первый домен мономера цитокина, который содержит спирали А-С второго мономера цитокина и спирали D-F первого мономера цитокина (см., например, «расщепленный домен» на Фигуре 28), а также второй домен мономера цитокина, который содержит спирали D-F второго мономера цитокина и спирали А-С первого мономера цитокина (см., например, «непрерывный домен» на Фигуре 28), где линкерный пептид соединяет спираль F второго мономера цитокина со спиралью А первого мономера цитокина.

Примерные гомомерные фолдикины на основе цитокина класса II с обменяемым доменом включают димерный IL-10.

Согласно воплощению димерный IL-10 содержит или состоит из последовательности

```

CTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLKESLLEDFKGYLGCAQSEMIQFYLEEVMFQ

```

```

      hhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                HA                                HB
AENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINY
hhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhh      hhhhhh
                HC                                HD                                HE
IEAYMTMKIRN (NtCt) PNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLKESLLEDFKGYLGQALSEMIQFYLEEY
hhhhhhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
      HF                                HA                                HB
MPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIF
hhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhh      hhh
                HC                                HD                                HE
INYLEAYMTM_YY
hhhhhhhhhh
HF

```

где (NtCt) представляет собой пептидный линкер (последовательность SEQ ID NO: 11-(NtCt)-SEQ ID NO: 12),

или последовательность, идентичную ему по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%, и сохраняющую по меньшей мере ту же стабильность и/или, по меньшей мере, тот же уровень взаимодействия с рецептором IL-10. Положения спиралей представлены строками «h» в приведенной выше последовательности.

Согласно одному воплощению линкер NtCt представляет собой пептидный линкер и содержит последовательность NGGLDY (SEQ ID NO: 13) или состоит из нее.

В частности, одноцепочечный димерный IL-10 может содержать или состоять из SEQ ID NO: 9 (так называемый полипептид MutSC1 в примере 1) или SEQ ID NO: 10 (так называемый полипептид MutSC2 в примере 1), или последовательность, идентичную ему по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%, и сохраняющую по меньшей мере ту же стабильность и/или, по меньшей мере, тот же уровень взаимодействия с рецептором IL-10.

Другой примерный гомомерный фолдикин на основе цитокина класса II с обмениваемым доменом включает димерный IFN γ .

Согласно воплощению димерный IFN γ содержит или состоит из последовательности

QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGLILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQK
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hh hhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hh
 HA HB
SVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPMLF (NtCt)
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhh hhhhhhh
 HC HD HE HF
MQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGLILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDD
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 HA HB
QSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPAAKTGKRKRSQ
 hhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhh---hhhhhhhh
 HC HD HE HF
MLFRGRRASQ_YY

где (NtCt) представляет собой пептидный линкер (последовательность SEQ ID NO: 14-(NtCt)-SEQ ID NO: 15) или последовательность, идентичную ему по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%, и сохраняющую по меньшей мере ту же стабильность и/или, по меньшей мере, тот же уровень взаимодействия с рецептором IFN γ . Положения спиралей представлены строками «h» в приведенной выше последовательности.

Согласно воплощению линкер NtCt содержит или состоит из последовательности EGPG (SEQ ID NO: 16) или ASKPHPGQLWY (SEQ ID NO: 17).

В частности, одноцепочечный димерный IFN γ может содержать или состоять из SEQ ID NO:18 или последовательности, идентичной ему по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%, и сохраняющей по меньшей мере ту же стабильность и/или, по меньшей мере, тот же уровень взаимодействия с рецептором IFN γ .

Фолдикины, включающие цитокины, которые не образуют цитокины с обмениваемым доменом

Согласно этому аспекту изобретения полипептид одноцепочечного димерного цитокина содержит: (а) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (б) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где последовательность второго домена мономера цитокина или его функциональной части является непрерывной, в то время как последовательность первого домена мономера цитокина такова, что первая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на N-конце второго мономера цитокина или его функциональной части, а вторая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на C-конце второго мономера цитокина или его функциональной части.

Существует три различных способа получения фолдикина, которые могут включать

два одинаковых или разных цитокина класса I, два одинаковых или разных цитокина класса II или один цитокин класса I и один цитокин класса II.

Согласно воплощению первый и второй мономеры цитокина представляют собой мономеры цитокинов класса I, которые не образуют димеры с обмениваемым доменом, где первый и второй мономеры цитокинов идентичны или различны.

Согласно другому воплощению первый и второй мономеры цитокинов представляют собой мономеры цитокинов класса II, которые не образуют димеры с заменой доменов, где первый и второй мономеры цитокинов идентичны или различны.

Согласно другому воплощению первый мономер цитокина представляет собой мономер цитокина класса I, а второй мономер цитокина представляет собой мономер цитокина класса II, или первый мономер цитокина представляет собой мономер цитокина класса II, а второй мономер цитокина представляет собой мономер цитокина класса I.

- Способ А образования фолдикинов

Согласно этому способу образования фолдикина в каждом мономере цитокина размыкается петля, и новый N-конец разомкнутой петли мономера цитокина А соединяется с новым С-концом разомкнутой петли мономера цитокина В, и новый С-конец разомкнутой петли мономера А соединяется с новым N-концом разомкнутой петли мономера цитокина В. Природный (или исходный) N-конец и природный (или исходный) С-конец мономера цитокина А далее соединяются (или, альтернативно, соединяются природный/исходный N-конец и природный/исходный С-конец мономера цитокина В).

В соответствии с этим способом А получения фолдикина полипептид одноцепочечного димерного цитокина содержит: (а) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где последовательность второго домена мономера цитокина или его функциональной части является непрерывной (в частности, она вставлена в последовательность первого домена мономера цитокина), в то время как последовательность первого домена мономера цитокина такова, что первая часть последовательности первого домена мономера цитокина, которая расположена на N-конце второго домена мономера цитокина или его функциональной части, соответствует N-концевой части домена мономера природного цитокина, а вторая часть последовательности первого домена мономера цитокина, которая расположена на С-конце второго домена мономера цитокина или его функциональной части, соответствует С-концевой части домена мономера природного цитокина.

Структурно полипептид одноцепочечного димерного цитокина содержит:

i) расщепленный домен, который содержит свободные N- и С-концы

одноцепочечного полипептида димерного цитокина, а также первую и вторую части последовательности первого домена мономера цитокина в их природном порядке последовательности (т.е. первая часть первого домена мономера цитокина представляет собой N-концевую часть первого домена мономера цитокина и находится на N-конце одноцепочечного полипептида димерного цитокина, в то время как вторая часть первого домена мономера цитокина представляет собой C-концевую часть первого домена мономера цитокина и находится на C-конце одноцепочечного полипептида димерного цитокина); и

ii) непрерывный домен, который содержит второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, организованную в виде первой части последовательности и второй части последовательности второго домена мономера цитокина, причем первая и вторая части последовательности расположены в инвертированном порядке по сравнению с их природным порядком последовательности (т.е. вторая часть представляет собой C-концевую часть второго домена мономера цитокина и находится в области N-стороны первой части второго домена мономера цитокина, которая представляет собой N-концевую часть второго домена мономера цитокина);

где последовательности первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина в расщепленном домене разделены последовательностью непрерывного домена.

В случае цитокинов класса I, которые не образуют димеры с обмениваемым доменом, образование фолдикина может включать связывание двух цитокинов через два линкера после размыкания петли в каждом мономере (в частности, между α -спиралями B и C) и закрытия N- и C-концов одного из мономеров через линкер (см., например, Фигуры 31-32).

Согласно воплощению петля между α -спиралями C и D раскрывается в каждом мономере цитокина, благодаря чему обеспечивается полипептид одноцепочечного димера класса I, который содержит два мономера цитокина класса I, где указанный полипептид одноцепочечного димерного цитокина содержит:

a) линкерный пептид соединяет вторую α -спираль (α -спираль B) первого мономера цитокина класса I («Цитокин 2» на Фигуре 31) с третьей α -спиралью (α -спираль C) второго мономера цитокина класса I («Цитокин 1» на Фигуре 31);

b) линкерный пептид соединяет четвертую α -спираль (C-концевую α -спираль или α -спираль D) второго мономера цитокина класса I с первой α -спиралью (N-концевая α -спираль или α -спираль A) второго мономера цитокина

класса I; и

с) линкерный пептид соединяет вторую α -спираль (α -спираль В) второго мономера цитокина класса I с третьей α -спиралью (α -спираль С) первого мономера цитокина класса I.

В указанном одноцепочечном димерном цитокине природный N-конец и С-конец первого мономера цитокина класса I являются свободными.

В целом, полипептид одноцепочечного димера класса I содержит, от N-конца к С-концу, i) N-концевую часть первого мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль А и В указанного первого мономера цитокина класса I, ii) линкерный пептид, соединяющий α -спираль В указанного первого мономера цитокина класса I с α -спиралью С второго мономера цитокина класса I, iii) С-концевую часть указанного второго мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль С и D указанного второго мономера цитокина класса I, iv) линкерный пептид, соединяющий α -спираль D указанного второго мономера цитокина класса I с α -спиралью А указанного второго мономера цитокина класса I, v) N-концевую часть указанного второго мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль А и В указанного второго мономера цитокина класса I, vi) линкерный пептид, соединяющий α -спираль В второго мономера цитокина класса I с α -спиралью С первого мономера цитокина класса I, и vii) С-концевую часть указанного первого мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль С и D указанного первого мономера цитокина класса I (Фигуры 31 и 32).

В некоторых воплощениях, после получения фолдикина класса I способом А, создается кольцевой перестановочный элемент, в котором природные Nt и Ct второго мономера цитокина класса I соединяются, и размыкается петля в первом и втором мономере цитокина класса I.

В случае цитокинов класса II, которые не образуют димеры с обмениваемым доменом, образование фолдикина может включать связывание двух цитокинов через два линкера после размыкания петли в каждом мономере (в частности, между α -спиралями С и D) и закрытия N- и С-концов одного из мономеров через линкер (см., например, Фигуры 5 и 27).

Согласно воплощению петля между α -спиралями С и D раскрыта в каждом мономере цитокина, и обеспечивается полипептид одноцепочечного димерного цитокина типа II, который содержит два мономера цитокина из цитокина(ов) класса II, которые не образуют димеры с обмениваемым доменом, где в указанном полипептиде одноцепочечного димерного цитокина типа II:

а) линкерная последовательность соединяет третью α -спираль (α -

спираль С) петвого мономера цитокина класса II («Цитокин 1» на Фигуре 27) с четвертой α -спиралью (α -спираль D) второго мономера цитокина класса II («Цитокин 2» на Фигуре 27);

b) линкерная последовательность соединяет четвертую α -спираль (α -спираль D) указанного первого мономера цитокина класса II с третьей α -спиралью (α -спираль С) указанного второго мономера цитокина класса II;

c) линкерная последовательность соединяет первую α -спираль (N-концевую α -спираль или α -спираль A) указанного первого мономера цитокина класса II с шестой α -спиралью (C-концевая α -спираль или α -спираль F) указанного первого мономера цитокина класса II; и

d) третья и четвертая α -спирали (α -спирали С и D) в каждом из указанных первого и второго мономеров цитокинов класса II не соединены.

В целом, полипептид одноцепочечного димера класса II содержит, от N-конца к C-концу, i) N-концевую часть первого мономера цитокина класса II, содержащую α -спирали A-C указанного первого мономера цитокина класса II, ii) линкерный пептид, соединяющий α -спираль С указанного первого мономера цитокина класса II с α -спиралью D второго мономера цитокина класса II, iii) C-концевую часть указанного второго мономера цитокина класса II, содержащую α -спирали D-F указанного второго мономера цитокина класса II, iv) линкерный пептид, соединяющий α -спираль F указанного второго мономера цитокина класса I с α -спиралью A указанного второго мономера цитокина класса II, v) N-концевую часть указанного второго мономера цитокина класса II, содержащую α -спирали A-C указанного второго мономера цитокина класса II, vi) линкерный пептид, соединяющий α -спираль С второго мономера цитокина класса II с α -спиралью D первого мономера цитокина класса II, и vii) C-концевую часть указанного первого мономера цитокина класса II, содержащую α -спирали D-F указанного первого мономера цитокина класса II.

В любых таких воплощениях два мономера цитокина класса II происходят из одного цитокина класса II, который не образует димеры с обмениваемым доменом, или из двух разных цитокинов класса II, которые не образуют димеры с обмениваемым доменом.

Типичные гомомерные фолдикины на основе цитокинов класса II включают:

i) димерный IL-22, который может содержать или состоять из последовательности

```
RLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFT
                hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhh             hhhhhhhhhhhhhhh
                       HA                                         HB
LEEVLFPQSDRFQPYMQEVVFPFLARLSNRLS (Xn1) HIQRNVQKLKDTVKKLGESGE
h---hhhh             hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhhhhhhhhhhhhhhh             hhh
```

```

HC HD
IKAIGELDLLFMSLRNACI (NtCt) LDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKL
hhh hhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhh hh
HE HF HA
FHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLS (Xn2) HIQR
h hhhhhhhhhhhhh hhh hhhhhhhhhhhhhhhhh hhh
HB HC
NVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
hhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhh
HD HE HF

```

(SEQ ID NO: 325-(Xn1)-SEQ ID NO: 326-(NtCt)-SEQ ID NO: 327-(Xn2)-SEQ ID NO: 328) или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II (IL-22);

ii) димерный IL-19 (который может содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 195-(Xn1)-SEQ ID NO: 196-(NtCt)-SEQ ID NO: 197-(Xn2)-SEQ ID NO: 198 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II),

iii) димерный IL-20 (который может содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 200-(Xn1)-SEQ ID NO: 201-(NtCt)-SEQ ID NO: 202-(Xn2)-SEQ ID NO: 203 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II),

iv) димерный IL-26 (который может содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 210-(Xn1)-SEQ ID NO: 211-(NtCt)-SEQ ID NO: 212-(Xn2)-SEQ ID NO: 213 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II),

v) димерный IFN λ 2 (который может содержать или состоять из

последовательности SEQ ID NO: 215-(Xn1)-SEQ ID NO: 216-(NtCt)-SEQ ID NO: 217-(Xn2)-SEQ ID NO: 218 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II),

vi) димерный IFN λ 3 (который может содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 220-(Xn1)-SEQ ID NO: 221-(NtCt)-SEQ ID NO: 222-(Xn2)-SEQ ID NO: 223 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II),

vii) димерный IFN λ 1 (который может содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 225-(Xn1)-SEQ ID NO: 226-(NtCt)-SEQ ID NO: 227-(Xn2)-SEQ ID NO: 228 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II),

viii) димерный IFN α 1/13 (который может содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 230-(Xn1)-SEQ ID NO: 231-(NtCt)-SEQ ID NO: 232-(Xn2)-SEQ ID NO: 233 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II),

ix) димерный IFN α 2 (который может содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 235-(Xn1)-SEQ ID NO: 236-(NtCt)-SEQ ID NO: 237-(Xn2)-SEQ ID NO: 238 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II),

x) димерный IFN β (который может содержать или состоять из

последовательности SEQ ID NO: 240-(Xn1)-SEQ ID NO: 241-(NtCt)-SEQ ID NO: 242-(Xn2)-SEQ ID NO: 243 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II),

xi) димерный IFN Ω 1 (который может содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 245-(Xn1)-SEQ ID NO: 246-(NtCt)-SEQ ID NO: 247-(Xn2)-SEQ ID NO: 248 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II),

xii) димерный IFN ϵ (который может содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 250-(Xn1)-SEQ ID NO: 251-(NtCt)-SEQ ID NO: 252-(Xn2)-SEQ ID NO: 253 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II),

xiii) димерный IFN κ (который может содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 255-(Xn1)-SEQ ID NO: 256-(NtCt)-SEQ ID NO: 257-(Xn2)-SEQ ID NO: 258 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного цитокина класса II), или

где (NtCt), (Xn1) и (Xn2) представляют собой пептидные линкеры.

В любых таких аспектах и воплощениях линкерная последовательность (NtCt), соединяющая N- и C-концы одного мономера, может иметь любую подходящую последовательность; и предпочтительно содержит последовательность, которая определяет конформационно ограниченную структуру, т.е. «структурированный» линкер. Такие линкеры могут иметь от около 3 до около 20 аминокислотных остатков; от около 3 до около 16 аминокислотных остатков; от около 4 до около 12 аминокислотных остатков, от около 4 до около 8 аминокислотных остатков, от около 3 до около 8 аминокислотных

остатков или от около 3 до около 6 аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях такие линкеры не содержат множества остатков Gly и/или Ser, соседних друг с другом; например, где линкерный пептид содержит 5 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; предпочтительно 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; 2 или менее остатков Gly и/или Ser; содержит только выделенные остатки Gly и/или Ser; или в некоторых воплощениях не содержит остатков Gly и/или Ser.

Линкер можно спроектировать путем моделирования для взаимодействия с рецепторами, поскольку авторы изобретения обнаружили, что спроектированный линкер лучше, чем линкер polyGly-Ser той же длины.

Примерный структурированный (NtCt) линкер содержит или состоит из последовательности ANGТ (SEQ ID NO: 329), или ANGV (SEQ ID NO: 330), или TDYDSQTN (SEQ ID NO: 303).

Другой примерный структурированный (NtCt) линкер содержит или состоит из последовательности EGPG (SEQ ID NO: 304), в частности, где фолдикин представляет собой димерный IFN- β .

Аналогично, сконструированные линкеры (Xn1) и (Xn2), соединяющие две мономерные последовательности, могут иметь любую подходящую последовательность; и, в частности, содержат последовательность, которая определяет конформационно ограниченную структуру, т.е. «структурированный» линкер. Такие линкеры могут иметь от около 3 до около 20 аминокислотных остатков; от около 3 до около 16 аминокислотных остатков; от около 4 до около 12 аминокислотных остатков, от около 4 до около 8 аминокислотных остатков, от около 3 до около 8 аминокислотных остатков или от около 3 до около 6 аминокислотных остатков. Преимущество таких линкеров состоит в том, что они не содержат множества остатков Gly и/или Ser, расположенных рядом друг с другом; например, где линкерный пептид содержит 5 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; предпочтительно 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; 2 или менее остатков Gly и/или Ser; содержит только выделенные остатки Gly и/или Ser; или в некоторых воплощениях не содержит остатков Gly и/или Ser.

Иллюстративная пара подходящих линкеров, соединяющих две мономерные последовательности, содержит или состоит из:

- i) последовательностей, спроектированных с использованием алгоритма дизайна белков (т.е. FoldX, ModelX), так что линкеры взаимодействуют либо сами с собой, либо с двумя доменами цитокинов, тем самым принимая предпочтительную конформацию; иллюстративные последовательности включают Xn1 = TCMPPGSKT (SEQ ID NO: 337) и Xn2 = RLELLP (SEQ ID

NO: 331) или $X_{n1} = \text{NRLKKLMASD}$ (SEQ ID NO: 332) и $X_{n2} = \text{RLELLP}$ (SEQ ID NO: 331);

ii) гибкие последовательности, состоящие из остатков Gly и Ser в различных пропорциях, при условии, что длина линкеров остается короткой (предпочтительно меньше или равна 6, 5, 4 или 3 остаткам), предотвращая сворачивание части расщепленного домена на части непрерывного домена; иллюстративные последовательности включают $X_{n1} = X_{n2} = \text{GGG}$, или GGGSGG (SEQ ID NO: 273), или GGGSGGSGG (SEQ ID NO: 333), или GGGSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 334); или

iii) Жесткие последовательности, состоящие из остатков Pro, образующих спираль PolyPro любой длины; иллюстративные последовательности включают $X_{n1} = X_{n2} = \text{GPG}$, или GPPPPPPPG (SEQ ID NO: 335), или GPPPPPPPPPG (SEQ ID NO: 336),

в частности, где фолдикин представляет собой димерный IL-22.

В некоторых воплощениях, после получения фолдикина класса II способом А, создается кольцевой перестановочный элемент, в котором природные Nt и Ct второго мономера цитокина класса II соединяются, и размыкается петля в первом втором мономере цитокина класса II.

В соответствии с некоторыми воплощениями предлагается одноцепочечный димерный IL-22, который содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 287 или SEQ ID NO: 288, или последовательности, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичной им, которая сохраняет по меньшей мере ту же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с рецептором IL-22 1 и/или рецептором 2 IL-22, что и полипептид IL-22.

Согласно некоторым воплощениям предлагается одноцепочечный химерный полипептид IL-10-IL-22, который содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 76 или последовательности, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичной им, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с рецептором IL-10 и рецептором IL-22.

Фолдикин, содержащий цитокин как класса I, так и класса II, может быть спректрирован таким же способом А, как описано для фолдикинов на основе цитокина класса I или класса II.

Согласно этому воплощению в полипептиде одноцепочечного димерного цитокина по изобретению один из первого и второго мономеров цитокина представляет собой

мономер цитокина класса I, а другой из первого и второго мономеров цитокина представляет собой мономер цитокина класса II.

В первой схеме два цитокина связываются через два сконструированных пептидных линкера после размыкания природной петли в цитокинах типа I и типа II и замыкания природных N- и C-концов цитокина типа II или цитокина типа I через линкер.

- Способ В образования фолдикинов

Согласно этому способу образования фолдикина природный N-конец мономера цитокина А соединяется с природным C-концом мономера цитокина В, а природный C-конец мономера цитокина В соединяется с природным N-концом мономера цитокина А. Петля раскрывается либо в мономере цитокина А, либо в мономере цитокина В.

Эксперименты, проведенные путем создания кольцевых перестановочных элементов мономерных цитокинов, в которых мы связываем природные Nt и Ct и размыкаем в белке разные петли (см. пример 4), показывают, какие петли можно раскрыть без ущерба для функциональности цитокинов.

Согласно этому способу В получения фолдикина полипептид одноцепочечного димерного цитокина содержит: (а) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где последовательность второго домена мономера цитокина или его функциональной части является непрерывной, в то время как последовательность первого домена мономера цитокина такова, что первая часть последовательности первого домена мономера цитокина, расположенная на N-конце второго домена мономера цитокина, или его функциональная часть, соответствует C-концевой части домена мономера природного цитокина, а вторая часть последовательности первого домена мономера цитокина расположенная на C-конце второго домена мономера цитокина или его функциональной части, соответствует N-концевой части домена природного домена мономера цитокина.

Структурно полипептид одноцепочечного димерного цитокина содержит:

i) расщепленный домен, который содержит свободные N- и C-концы одноцепочечного полипептида димерного цитокина, а также первую и вторую части последовательности первого домена мономера цитокина в порядке, инвертированном по сравнению с их природным порядком последовательностей (т.е. вторая часть, которая представляет собой C-концевую часть первого домена мономера цитокина, находится на N-стороне первой части первого домена мономера цитокина, которая представляет собой N-концевую часть первого домена мономера цитокина); и

ii) непрерывный домен, который содержит второй домен мономера цитокина или его функциональную часть в природном порядке последовательности (т.е. в направлении

от N-конца к С-концу);

где последовательности первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина в расщепленном домене разделены последовательностью непрерывного домена.

В случае цитокинов класса I, которые не образуют димеры с обмениваемым доменом, образование фолдикина в соответствии со способом В включает связывание двух мономерных цитокинов класса I через два линкера, чтобы соединить соответственно N- и С-концы каждого мономера цитокина, с последующим раскрытием петли в одном из мономеров для создания новых N- и С-концов для одноцепочечного полипептида. Петля, которая должна быть раскрыта в одном мономере цитокина класса I, может представлять собой петлю между α -спиралями А и В, между α -спиралями В и С или между α -спиралями С и D.

Согласно некоторым воплощениям предлагается полипептид одноцепочечного димера класса I, который содержит два домена мономера цитокина класса I или их функциональную часть, где в указанном полипептиде одноцепочечного димерного цитокина:

a) линкерный пептид соединяет четвертую α -спираль (α -спираль D) мономера цитокина класса I (например, «Цитокин 2» на Фигуре 26) с первой α -спиралью (α -спираль А) второго мономера цитокина класса I (например, «Цитокин 1» на Фигуре 26);

b) линкерный пептид соединяет четвертую α -спираль (С-концевую α -спираль или α -спираль D) второго мономера цитокина класса I с первой α -спиралью (N-концевая α -спираль или α -спираль А) первого мономера цитокина класса I; и

c) либо α -спирали А и В указанного первого мономера цитокина класса I не соединены мостиками, либо α -спирали В и С указанного первого мономера цитокина класса I не соединены мостиками, либо α -спирали С и D указанного первого мономера цитокина класса I не соединены мостиками.

В указанном одноцепочечном димерном цитокине новые N-конец и С-конец, образованные путем размыкания петли в первом мономере цитокина класса I, являются свободными.

Согласно одному воплощению петля между α -спиралями В и С разомкнута в одном мономере цитокина, и полипептид одноцепочечного димера класса I содержит от N-конца к С-концу, i) С-концевую часть первого мономера цитокина класса I, содержащий α -спирали С и D указанного первого мономера цитокина класса I, ii) линкерный пептид,

соединяющий α -спираль D указанного первого мономера цитокина класса I с α -спиралью A второго мономера цитокина класса I, iii) часть указанного второго мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль A-D указанного второго мономера цитокина класса I, iv) линкерный пептид, соединяющий α -спираль D указанного второго мономера цитокина класса I с α -спиралью A указанного первого мономера цитокина класса I; и v) N-концевую часть указанного первого мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль A и B.

Согласно одному воплощению петля между α -спиралями A и B раскрыта в одном мономере цитокина, и полипептид одноцепочечного димера класса I содержит от N-конца до C-конца, i) C-концевую часть первого мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль B-D указанного первого мономера цитокина класса I, ii) линкерный пептид, соединяющий α -спираль D указанного первого мономера цитокина класса I с α -спиралью A второго мономера цитокина класса I, iii) часть указанного второго мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль A-D указанного второго мономера цитокина класса I, iv) линкерный пептид, соединяющий α -спираль D указанного второго мономера цитокина класса I с α -спиралью A указанного первого мономера цитокина класса I; и v) N-концевую часть указанного первого мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль A.

Согласно одному воплощению петля между α -спиралями C и D раскрыта в одном мономере цитокина, и полипептид одноцепочечного димера класса I содержит от N-конца к C-концу, i) C-концевую часть первого мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль и D указанного первого мономера цитокина класса I, ii) линкерный пептид, соединяющий α -спираль D указанного первого мономера цитокина класса I с α -спиралью A второго мономера цитокина класса I, iii) часть указанного второго мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль A-D указанного второго мономера цитокина класса I, iv) линкерный пептид, соединяющий α -спираль D указанного второго мономера цитокина класса I с α -спиралью A указанного первого мономера цитокина класса I; и v) N-концевую часть указанного первого мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль A-C.

В контексте мономера цитокина IL-2 и со ссылкой на последовательность SEQ ID NO:79 (без сигнального пептида) было показано, в частности, что мономер может быть разомкнут в петле в положениях 49-54 (в частности, между остатками в положениях 52-53) или 69-76 (в частности, между остатками в положениях 68-69) между α -спиралями A и B, в петле в положениях 91-101 (в частности, между остатками в положениях 96-97) между α -спиралями B и C или в петле в положениях 117-125 (в частности, между остатками в положениях 120-121) между α -спиралями C и D (см. Фигуры 43).

В некоторых воплощениях, после получения фолдикина класса I способом B, создается кольцевой перестановочный элемент, в котором природные Nt и Ct второго

мономера цитокина класса I соединяются, и размыкается петля в первом и втором мономере цитокина класса I.

Пример одноцепочечного димерного полипептида класса I, который содержит мономеры цитокинов IL-2 и IL-4 (где IL-4 содержит непрерывный домен), содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 295 или последовательности по меньшей мере на 80%, 85 %, 90%, 95%, 98% или на 99% идентичной ей, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере такой же уровень взаимодействия с рецептором IL-2 и рецептором IL-4.

Примерные гетеродимерные фолдикины на основе цитокинов класса I включают:

```

MYRMQLLSSCIALSLALVTNSLRPRDLISNINVIVLELKGETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII
    hhhhh-hhhhhhhhhh                    hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
    IL-2 HC                               IL-2 HD
STLTLGPPPPPGHKCDITLQEI IKTLSLSTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHH
H hhhhhhhhhhhh hhh                    hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
    IL-4 HA                               IL-4 HB
EKDTRCLGATAQQFHHRKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS
    hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh    hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
    IL-4 HC                               IL-4 HD
GPPPPPGTKKTQLQLEHLLDLDQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEV
    hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh    hhhhhhhh---hhhhhh
    IL2-HA                                IL-2 HB
LNLAQS*
  
```

Примерные гомомерные фолдикины на основе короткоцепочечного цитокина класса I включают:

- i) димерный IL-2 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 89-(Xn1)-SEQ ID NO: 90-(Xn2)-SEQ ID NO: 91),
- ii) димерный IL-4 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 93-(Xn1)-SEQ ID NO: 94-(Xn2)-SEQ ID NO: 95),
- iii) димерный IL-3 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 97-(Xn1)-SEQ ID NO: 98-(Xn2)-SEQ ID NO: 99),
- iv) димерный IL-7 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 103-(Xn1)-SEQ ID NO: 104-(Xn2)-SEQ ID NO: 105),
- v) димерный IL-9 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 107-(Xn1)-SEQ ID NO: 108-(Xn2)-SEQ ID NO: 109),
- vi) димерный IL-15 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 110-(Xn1)-SEQ ID NO: 111-(Xn2)-SEQ ID NO: 112),
- vii) димерный IL-21 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 113-(Xn1)-SEQ ID NO: 114-(Xn)-SEQ ID NO: 115),
- viii) димерный TSLP (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 116-(Xn1)-SEQ ID NO: 117-(Xn2)-SEQ ID NO: 118) и

ix) димерный GM-CSF (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 120-(Xn1)-SEQ ID NO: 121-(Xn2)-SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 101),

или последовательность, по меньшей мере, на 95%, 98% или на 99% идентичную им, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим рецептором(ами) указанного мономерного короткоцепочечного цитокина класса I;

где (Xn1) и (Xn2) представляют собой пептидные линкеры.

Примерный гомомерный Фолдикин на основе длинноцепочечного цитокина класса I включает:

i) димерный IL-6 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 135-(Xn1)-SEQ ID NO: 136-(Xn2)-SEQ ID NO: 137),

ii) димерный IL-11 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 139-(Xn1)-SEQ ID NO: 140-(Xn2)-SEQ ID NO: 141),

iii) димерный IL-12 α (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 143-(Xn1)-SEQ ID NO: 144-(Xn2)-SEQ ID NO: 145),

iv) димерный IL-23 α (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 147-(Xn1)-SEQ ID NO: 148-(Xn2)-SEQ ID NO: 149),

v) димерный IL-27 α (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 151-(Xn1)-SEQ ID NO: 153-(Xn2)-SEQ ID NO: 153),

vi) димерный IL-31 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 154-(Xn1)-SEQ ID NO: 155-(Xn2)-SEQ ID NO: 156),

vii) димерный CLCF1 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 158-(Xn1)-SEQ ID NO: 159-(Xn2)-SEQ ID NO: 160),

viii) димерный ONCM (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 161-(Xn1)-SEQ ID NO: 162-(Xn2)-SEQ ID NO: 163),

ix) димерный CTF1 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 165-(Xn1)-SEQ ID NO: 166-(Xn2)-SEQ ID NO: 167),

x) димерный CNTF (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 169-(Xn1)-SEQ ID NO: 170-(Xn2)-SEQ ID NO: 171),

xi) димерный LIF (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 173-(Xn1)-SEQ ID NO: 174-(Xn2)-SEQ ID NO: 175) и

xii) димерный CSF3 (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 177-(Xn1)-SEQ ID NO: 178-(Xn2)-SEQ ID NO: 179),

или последовательность, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичную им, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность

и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим рецептором(ами) указанного мономерного длинноцепочечного цитокина класса I;

где (Xn1) и (Xn2) представляют собой пептидные линкеры.

В любых таких аспектах и воплощениях линкерные пептиды (Xn1) и (Xn2), соединяющие α -спирали, например между С-концом одного мономера и N-концом другого мономера может быть любая подходящая последовательность; и предпочтительно содержит последовательность, которая определяет конформационно ограниченную структуру, т.е. «структурированный» линкер. Такие линкеры могут иметь от около 3 до около 20 аминокислотных остатков; от около 3 до около 16 аминокислотных остатков; от около 4 до около 12 аминокислотных остатков, от около 4 до около 8 аминокислотных остатков, от около 3 до около 8 аминокислотных остатков или от около 3 до около 6 аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях такие линкеры не содержат множества остатков Gly и/или Ser, соседних друг с другом; например, где линкерный пептид содержит 5 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; предпочтительно 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; 2 или менее остатков Gly и/или Ser; содержит только выделенные остатки Gly и/или Ser; или в некоторых воплощениях не содержит остатков Gly и/или Ser. Предпочтительно такие линкеры содержат по меньшей мере два смежных остатка Pro, предпочтительно 3, 4, 5 или 6 смежных остатков Pro, образующих жесткую спираль PolyPro. В некоторых воплощениях пептидные линкеры Xn1 и Xn2 идентичны.

В некоторых воплощениях димерный IL-2 содержит или состоит из SEQ ID NO: 89-(Xn1)-SEQ ID NO: 90-(Xn2)-SEQ ID NO: 91, где пептидные линкеры Xn1 и Xn2 идентичны и содержат или состоят из последовательности GPPPPG (SEQ ID NO: 270), GPPPPPG (SEQ ID NO: 271), GPPPPPPG (SEQ ID NO: 272), GGGSGG (SEQ ID NO: 273), GGGSGGG (SEQ ID NO: 274) или GGGSGGGG (SEQ ID NO: 275). В этих воплощениях димерный IL-2 может дополнительно содержать остаток Lys непосредственно в SEQ ID NO: 89 и дипептид Gln-Ser непосредственно в C-ter SEQ ID NO: 91 (последовательность K-SEQ ID NO: 89-(Xn1)-SEQ ID NO:90-(Xn2)-SEQ ID NO:91-QS).

В случае цитокинов класса II, которые не образуют димеры с обмениваемым доменом, образование фолдикина в соответствии со способом В включает связывание двух мономерных цитокинов класса II через два линкера, чтобы соединить соответственно N- и С-концы каждого мономера цитокина, с последующим раскрытием петли в одном из мономеров для создания новых N- и С-концов одноцепочечного полипептида. Петля, раскрывающаяся в одном мономере цитокина класса II, может представлять собой петлю между α -спиралями А и В, между α -спиралями В и С, между α -спиралями С и D, между α -

спиралями D и E или между α -спиралями D и E или между α -спиралями E и F.

Согласно некоторым воплощениям предлагается полипептид одноцепочечного димерного цитокина типа II, который содержит два мономера цитокина из цитокина(ов) класса II, который(е) не образует(ют) димеры с обмениваемым доменом, где в указанном полипептиде одноцепочечного димерного цитокина типа II:

а) линкерная последовательность соединяет первую α -спираль (N-концевую α -спираль или α -спираль A) первого мономера цитокина класса II (например, «Цитокин 1» на Фигуре 33) с шестой α -спиралью (C-концевая α -спираль или α -спираль F) второго мономера цитокина класса II (например, «Цитокин 2» на Фигуре 33);

б) линкерная последовательность соединяет шестую α -спираль (C-концевую α -спираль или α -спираль F) указанного первого мономера цитокина класса II с первой α -спиралью (C-концевая α -спираль или α -спираль A) указанного второго мономера цитокина класса II; и

с) первая и вторая вторая α -спирали (α -спирали A и B), вторая и третья α -спирали (α -спирали B и C), третья и четвертая α -спирали (α -спирали C и D), четвертая и пятая α -спирали (α -спирали D и E) или пятая и шестая α -спирали (α -спирали E и F) указанного первого мономера цитокина класса II не связаны мостиками.

В указанном одноцепочечном димерном цитокине новые N-конец и C-конец, образованные путем размыкания петли в мономере цитокина первого класса II, являются свободными.

Согласно одному воплощению петля между α -спиралями B и C разомкнута в первом мономере цитокина класса II, и полипептид одноцепочечного димера класса II содержит от N-конца к C-концу i) C-концевую часть первого мономера цитокина класса II, содержащую α -спирали C-F указанного первого мономера цитокина класса II, ii) линкерный пептид, соединяющий α -спираль F указанного первого мономера цитокина класса II с α -спиралью A второго мономера цитокина класса II, iii) часть указанного второго мономера цитокина класса II, содержащую α -спирали A-F указанного второго мономера цитокина класса II, iv) линкерный пептид, соединяющий α -спираль F указанного второго мономера цитокина класса II с α -спиралью A указанного первого мономера цитокина класса II, и v) N-концевую часть указанного второго мономера цитокина класса I, содержащую α -спирали A и B.

Согласно одному воплощению петля между α -спиралями C и D раскрыта в первом мономере цитокина класса II, и полипептид одноцепочечного димера класса II содержит

от N-конца к C-концу i) C- концевую часть первого мономера цитокина класса II, содержащую α -спираль D-F указанного первого мономера цитокина класса II, ii) линкерный пептид, соединяющий α -спираль F указанного первого мономера цитокина класса II с α -спиралью A второго мономера цитокина класса II, iii) часть указанного второго мономера цитокина класса II, содержащую α -спираль A-F указанного второго мономера цитокина класса II, iv) линкерный пептид, соединяющий α -спираль F указанного второго мономера цитокина класса II с α - спиралью A указанного первого мономера цитокина класса II, и v) N-концевую часть указанного первого мономера цитокина класса II, содержащую α -спираль A-C.

Согласно воплощению петля между α -спиралями E и F раскрыта в первом мономере цитокина класса II, и полипептид одноцепочечного димера класса II содержит от N-конца к C-концу: i) C- концевую часть первого мономера цитокина класса II, содержащую α -спираль F указанного первого мономера цитокина класса II, ii) линкерный пептид, соединяющий α -спираль F указанного первого мономера цитокина класса II с α -спиралью A второго мономера цитокина класса II, iii) часть указанного второго мономера цитокина класса II, содержащую α -спираль A-F указанного второго мономера цитокина класса II, iv) линкерный пептид, соединяющий α -спираль F указанного второго мономера цитокина класса II с α -спиралью A указанного первого мономера цитокина класса II, и v) N-концевую часть указанного первого мономера цитокина класса II, содержащую α -спираль A-E.

В контексте мономера цитокина IL-22 и со ссылкой на последовательность SEQ ID NO:291 (без сигнального пептида) было показано, в частности, что мономер может быть разомкнут в петле в положениях 102-113 (в частности, между остатками в положениях 108-109) между α -спиралями B и C, или в петле в положениях 129-140 (в частности, между остатками в положениях 134-135) между α -спиралями C и D, или в петле в положениях 165-167 (в частности, между остатками в положениях 164-165) между α -спиралями E и F (см. Фигуру 41).

В контексте мономера цитокина IFN β и со ссылкой на последовательность SEQ ID NO:291 (без сигнального пептида) было показано, в частности, что мономер может быть открыт в петле в положениях 34-51 (в частности, между остатками в положениях 49-50) между α -спиралями A и B, или в петле в положениях 71-81 (в частности, между остатками в положениях 75-76) между α -спиралями B и C, или в петле в положениях 108-121 (в частности, между остатками в положениях 117-118) между α -спиралями C и D (см. Фигуру 42).

В любых таких аспектах и воплощениях линкерные пептиды (Xn1) и (Xn2),

соединяющие α -спирали, например между С-концом одного мономера и N-концом другого мономера может быть любая подходящая последовательность; и предпочтительно содержит последовательность, которая определяет конформационно ограниченную структуру, т.е. «структурированный» линкер. Такие линкеры могут иметь от около 3 до около 20 аминокислотных остатков; от около 3 до около 16 аминокислотных остатков; от около 4 до около 12 аминокислотных остатков, от около 4 до около 8 аминокислотных остатков, от около 3 до около 8 аминокислотных остатков или от около 3 до около 6 аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях такие линкеры не содержат множества остатков Gly и/или Ser, соседних друг с другом; например, где линкерный пептид содержит 5 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; предпочтительно 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; 2 или менее остатков Gly и/или Ser; содержит только выделенные остатки Gly и/или Ser; или в некоторых воплощениях не содержит остатков Gly и/или Ser. Предпочтительно такие линкеры содержат по меньшей мере два смежных остатка Pro, предпочтительно 3, 4, 5 или 6 смежных остатков Pro, образующих жесткую спираль PolyPro.

В некоторых воплощениях пептидные линкеры Xn1 и Xn2 идентичны.

Фолдикин, содержащий мономер цитокина как типа I, так и типа II, может быть спектрирован таким же способом B, как описано для фолдикинов на основе цитокина класса I или класса II.

В этой схеме два цитокина связаны через два сконструированных линкерных пептида, соединяющих природный N-конец цитокина типа I с природным С-концом цитокина типа II и природный С-конец цитокина типа I с природным N-концом цитокина типа II и раскрывающих петли в цитокине типа I (см., например, Фигуру 6i) или в цитокине типа II (не показано).

В некоторых воплощениях, после получения фолдикина класса II способом B, создается кольцевой перестановочный элемент, в котором природные Nt и Ct второго мономера цитокина класса II соединяются, и размыкается петля в первом втором мономере цитокина класса II.

В любых таких аспектах и воплощениях линкерные последовательности, соединяющие N- и С-концы цитокинов типа I и типа II, могут иметь любую подходящую последовательность; и предпочтительно содержит последовательность, которая определяет конформационно ограниченную структуру, например «структурированный» линкер. Такие линкеры могут иметь от около 3 до около 20 аминокислотных остатков; от около 3 до около 16 аминокислотных остатков; от около 4 до около 12 аминокислотных остатков, от около 4 до около 8 аминокислотных остатков, от около 3 до около 8

аминокислотных остатков или от около 3 до около 6 аминокислотных остатков. Преимущество таких линкеров состоит в том, что они не содержат множества остатков Gly и/или Ser, расположенных рядом друг с другом; например, где линкерный пептид содержит 5 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; предпочтительно 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; 2 или менее остатков Gly и/или Ser; содержит только выделенные остатки Gly и/или Ser; или в некоторых воплощениях не содержит остатков Gly и/или Ser. Аналогично, сконструированные линкеры, соединяющие две мономерные последовательности, могут иметь любую подходящую последовательность; и, в частности, содержат последовательность, которая определяет конформационно ограниченную структуру, т.е. «структурированный» линкер. Такие линкеры могут иметь от около 3 до около 20 аминокислотных остатков; от около 3 до около 16 аминокислотных остатков; от около 4 до около 12 аминокислотных остатков, от около 4 до около 8 аминокислотных остатков, от около 3 до около 8 аминокислотных остатков или от около 3 до около 6 аминокислотных остатков. Преимущество таких линкеров состоит в том, что они не содержат множества остатков Gly и/или Ser, расположенных рядом друг с другом; например, где линкерный пептид содержит 5 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; предпочтительно 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; 2 или менее остатков Gly и/или Ser; содержит только выделенные остатки Gly и/или Ser; или в некоторых воплощениях не содержит остатков Gly и/или Ser.

В любых таких аспектах и воплощениях любые такие сконструированные линкерные пептидные последовательности (например, мостики между N- и C-концами цитокина типа I и концами разомкнутой петли цитокина типа II, а также последовательности, связывающие N- и C- концы цитокина типа II, если выбран этот вариант) могут иметь любую подходящую последовательность; и предпочтительно содержат последовательность, которая определяет конформационно ограниченную структуру, например «структурированный» линкер. Такие линкеры могут иметь от около 3 до около 20 аминокислотных остатков; от около 3 до около 16 аминокислотных остатков; от около 4 до около 12 аминокислотных остатков, от около 4 до около 8 аминокислотных остатков, от около 3 до около 8 аминокислотных остатков или от около 3 до около 6 аминокислотных остатков. Преимущество таких линкеров состоит в том, что они не содержат множества остатков Gly и/или Ser, расположенных рядом друг с другом; например, где линкерный пептид содержит 5 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; предпочтительно 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; 2 или менее остатков Gly и/или Ser; содержит только выделенные остатки Gly и/или Ser; или в некоторых воплощениях не содержит остатков Gly и/или Ser.

- Способ С образования фолдикинов

В случае цитокинов класса I и согласно способу С образования фолдикина петля раскрывается в одном мономере цитокина В класса I, и новый N-конец разомкнутой петли мономера цитокина В соединяется с природным (или исходным) С-концом мономера цитокина А, а новый С-конец разомкнутой петли мономера В соединяется с природным (или исходным) N-концом мономера цитокина А.

Согласно этому способу С получения фолдикина полипептид одноцепочечного димерного цитокина содержит: (а) домен первого мономера цитокина класса I или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина класса I или его функциональную часть, где последовательность первого домена мономера цитокина класса I или его функциональной части является непрерывной последовательностью, в то время как последовательность второго домена мономера цитокина такова, что первая часть последовательности второго мономера цитокина класса I, которая расположена на N-конце первого мономера цитокина класса I или его функциональной части, соответствует N-концевой части мономера природного цитокина класса I, а вторая часть последовательности второго мономера цитокина класса I, которая расположена на С-конце первого мономера цитокина класса I или его функциональной части, соответствует С-концевой части мономера природного цитокина класса I.

Одноцепочечный полипептид димерного цитокина класса I содержит

b) расщепленный домен, который содержит свободные N- и С-концы одноцепочечного полипептида димерного цитокина класса I, а также первую и вторую части последовательности второго домена мономера цитокина класса I; и

ii) непрерывный домен, который содержит первый домен мономера цитокина класса I или его функциональную часть;

где последовательности первой и второй частей последовательности второго домена мономера цитокина класса I в расщепленном домене разделены последовательностью непрерывного домена.

В случае цитокинов класса I образование фолдикина по способу С может включать размыкание петли в одном мономере (например, между α -спиралями В и С).

Согласно одному воплощению петля между α -спиралями В и С разомкнута в одном мономере цитокина, благодаря чему обеспечивается полипептид одноцепочечного димера класса I, который содержит два мономера цитокина класса I, где в указанном полипептиде одноцепочечного димерного цитокина:

a) линкерный пептид соединяет четвертую α -спираль (α -спираль D) первого мономера цитокина класса I (например, «Цитокин 1» на Фигуре 45) с

третьей α -спиралью (α -спираль С) второго мономера цитокина класса I (например, «Цитокин 2» на Фигуре 45);

b) линкерный пептид соединяет первую α -спираль (N-концевую α -спираль или α -спираль А) первого мономера цитокина класса I со второй α -спиралью (α -спираль В) второго мономера цитокина класса I; и

c) α -спирали В и С указанного второго мономера цитокина класса I не соединены.

В указанном одноцепочечном димерном цитокине исходный N-конец и С-конец второго мономера цитокина класса I являются свободными.

В целом, полипептид одноцепочечного димера класса I содержит, от N-конца к С-концу, i) N-концевую часть второго мономера цитокина класса I, содержащую α -спирали А и В указанного второго мономера цитокина класса I, ii) линкерный пептид (Xn1), соединяющий α -спираль В указанного второго мономера цитокина класса I с α -спиралью А первого мономера цитокина класса I, iii) непрерывный домен указанного первого мономера цитокина класса I, содержащий α -спирали А-D. iv) линкерный пептид (Xn2), соединяющий α -спираль D первого мономера цитокина класса I с α -спиралью С второго мономера цитокина класса I, и vii) С-концевую часть указанного второго мономера цитокина класса I, содержащего α -спирали С и D указанного первого мономера цитокина класса I.

Сконструированные линкеры (Xn1) и (Xn2), соединяющие две мономерные последовательности, могут иметь любую подходящую последовательность; и, в частности, содержат последовательность, которая определяет конформационно ограниченную структуру, т.е. «структурированный» линкер. Такие линкеры могут иметь от около 3 до около 20 аминокислотных остатков; от около 3 до около 16 аминокислотных остатков; от около 4 до около 12 аминокислотных остатков, от около 4 до около 8 аминокислотных остатков, от около 3 до около 8 аминокислотных остатков или от около 3 до около 6 аминокислотных остатков. Преимущество таких линкеров состоит в том, что они не содержат множества остатков Gly и/или Ser, расположенных рядом друг с другом; например, где линкерный пептид содержит 5 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; предпочтительно 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; 2 или менее остатков Gly и/или Ser; содержит только выделенные остатки Gly и/или Ser; или в некоторых воплощениях не содержит остатков Gly и/или Ser.

Согласно некоторым воплощениям предлагается одноцепочечный замкнутый перестроенный димерный полипептид IL-2, который содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: X338:

```

SSSTKKTQLQLEHLLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLA
  hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh           hhhhhhh---hhhhhhh
              HA                                HB
QSKGGSGGSSSTKKTQLQLEHLLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPL
  hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh           hhhhhhh---hhhh
              HA                                HB
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGSGG
  hhhhh-hhhhhhhhhhhhh             hhhhhhhhhhhhhhhhhhs
              HC                                HD
NFLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTG
  hhhhh-hhhhhhhhhhhhh             hhhhhhhhhhhhhhhhhhs
              HC                                HD

```

или последовательность, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичную им, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере такой же уровень взаимодействия с рецептором IL-2.

В некоторых воплощениях, после получения фолдикина класса I способом С, создается кольцевой перестановочный элемент, в котором природные Nt и Ct второго мономера цитокина класса I соединяются, и размыкается петля в первом и втором мономере цитокина класса I.

Согласно некоторым воплощениям предлагается одноцепочечный замкнутый перестроенный димерный полипептид IL-2, который содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 296 или последовательности по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичной ей, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с рецептором IL-2.

В случае цитокинов класса II, согласно этому способу С получения фолдикина, полипептид одноцепочечного димерного цитокина содержит: (a) первый домен мономера цитокина класса II или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина класса II или его функциональную часть, где последовательность второго домена мономера цитокина класса II или его функциональной части является непрерывной последовательностью, в то время как последовательность первого домена мономера цитокина класса II является такой что первая часть последовательности первого домена мономера цитокина класса II, которая расположена на N-конце второго домена мономера цитокина класса II или его функциональной части, соответствует N-концевой части домена мономера природного цитокина класса II, и вторая часть последовательности первого домена мономера цитокина класса II, которая расположена на C-конце второго домена мономера цитокина класса II или его функциональной части, соответствует C-концевой части домена мономера природного цитокина класса II.

В случае цитокинов класса II встроенная последовательность второго мономера цитокина класса II находится в ее природном порядке.

В соответствии с этим способом получения фолдикина полипептид одноцепочечного димерного цитокина класса II содержит (см. Фигуру 47):

i) расщепленный домен, который содержит свободные N- и C-концы одноцепочечного полипептида димерного цитокина класса II, а также первую и вторую части последовательности первого домена мономера цитокина класса II в их природном порядке последовательности; и

ii) непрерывный домен, который содержит второй домен мономера цитокина класса II или его функциональную часть;

где последовательности первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина II класса в расщепленном домене разделены последовательностью непрерывного домена второго домена мономера цитокина класса II.

В случае цитокинов класса II образование фолдикина по пути C может включать размыкание петли в одном мономере (в частности, между α -спиралями B и C одного мономера) и соединение вновь созданного C-конца с природным C_t другого мономера цитокина и присоединения вновь созданного N-конца к природному N-концу другого мономера цитокина.

Согласно одному воплощению петля между α -спиралями B и C раскрывается в первом мономере цитокина, благодаря чему обеспечивается полипептид одноцепочечного димера класса II, который содержит два мономера цитокина класса II, где в указанном полипептиде одноцепочечного димерного цитокина:

a) линкерный пептид соединяет вторую α -спираль (α -спираль B) первого мономера цитокина класса II («Цитокин 1» на Фигуре 47) с первой α -спиралью (α -спираль A) второго мономера цитокина класса II («Цитокин 2» на Фигуре 47); и

b) линкерный пептид соединяет третью α -спираль (α -спираль C) первого мономера цитокина класса II с первой α -спиралью (N-концевая α -спираль или α -спираль A) второго мономера цитокина класса II.

В указанном одноцепочечном димерном цитокине природный N-конец и C-конец мономера цитокина класса II являются свободными, а встроенная последовательность мономера цитокина класса II соответствует природному порядку последовательностей.

В целом полипептид одноцепочечного димера класса II содержит, от N-конца к C-концу, i) N-концевую часть первого мономера цитокина класса II, содержащую α -спирали A и B указанного первого мономера цитокина класса II, ii) линкерный пептид (X_n1), соединяющий α -спираль B указанного первого мономера цитокина класса II с α -спиралью A второго мономера цитокина класса II, iii) природную последовательность указанного

второго мономера цитокина класса II, содержащую α -спираль A-F указанного второго мономера цитокина класса II, iv) линкерный пептид (Xn2), соединяющий α -спираль F второго мономера цитокина класса II с α -спиралью C первого мономера цитокина класса II, и vii) N- концевую часть указанного первого мономера цитокина класса II, содержащую α -спираль C-F указанного первого мономера цитокина класса I.

Аналогично, сконструированные линкеры (Xn1) и (Xn2), соединяющие две мономерные последовательности, могут иметь любую подходящую последовательность, как описано выше в способах A и B получения фолдикина.

В некоторых воплощениях, после получения фолдикина класса II способом AC создается кольцевой перестановочный элемент, в котором природные Nt и Ct второго мономера цитокина класса II соединяются, и размыкается петля в первом втором мономере цитокина класса II.

Кроме того, фолдикин, содержащий домены мономеров цитокинов как типа I, так и типа II, может быть спроектирован таким же способом C, как описано для фолдикинов на основе цитокинов класса I или класса II.

На схеме C-a два мономера цитокина связаны через два линкера после размыкания природной петли в цитокине типа II и замыкания новых N- и C-концов разомкнутой петли через два сконструированных линкера с природными N- и C-концами цитокина типа I. Кроме того, может быть произведена его кольцевая перестановка, при которой природная петля цитокина типа I может быть раскрыта, а природные N- и C-концы цитокина типа II замкнуты с помощью линкера (см. Фигуру bii), или природная петля в цитокине типа I может быть раскрыта, и новые Nt и Ct связаны с природными N- и C-концами цитокина типа II, в то время как природные N- и C-концы цитокина типа I соединяются и в цитокине типа II размыкается петля, становясь новыми Nt и Ct.

Структурные шаблоны, используемые для определения угла между двумя 3D-доменами фолдикина.

При конструировании фолдикина из пары мономерных цитокинов может использоваться матрица/эталон на основе цитокина с обмениваемым доменом. Преимущество состоит в том, что любая такая матрица/эталон имеет структуру, аналогичную структуре желаемого полученного фолдикина, поскольку таким образом может сохраняться любой выгодный угол между двумя глобулярными доменами, который может быть важен при связывании четырех рецепторов с синтетическим фолдикином (см. Фигуры 7 и 8).

Полипептиды, содержащие фолдикин

Также предлагается полипептид, содержащий полипептид одноцепочечного димера

согласно изобретению.

В этих аспектах полипептид одноцепочечного димера может быть объединен или ковалентно связан с любым пептидом, таким как белковая метка, или другим полипептидом.

Рекомбинантные векторы, клетки-хозяева и экспрессия

Контрольные последовательности/Регуляторные последовательности

Термины «контрольная последовательность» или «регуляторная последовательность» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо для обозначения любой нуклеотидной последовательности, которая способна увеличивать или уменьшать экспрессию специфических генов. Эта регуляция может быть введена либо путем воздействия на скорость транскрипции, скорости трансляции, либо путем изменения стабильности последовательности. В воплощениях полинуклеотидные последовательности по настоящему изобретению содержат регуляторные элементы, такие как, без ограничения указанным, следующие: промоторы, энхансеры, маркеры селекции, точки начала репликации, линкерные последовательности, полиА-последовательности, терминаторные последовательности и последовательности деградации. В некоторых воплощениях полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит одну или более подходящих контрольных последовательностей. В некоторых воплощениях контрольные последовательности идентичны для всех полинуклеотидов по настоящему изобретению. В альтернативных воплощениях разные контрольные последовательности используются для разных полинуклеотидов или внутри них. В некоторых воплощениях контрольные последовательности представляют собой контрольные последовательности, встречающиеся в природе в прокариотической или эукариотической клетке-мишени. В других воплощениях управляющие последовательности адаптированы для выполнения намеченной функции в клетке-мишени, например, в бактерии. В некоторых воплощениях полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать последовательности меток, которые улучшают очистку или локализацию. Рассматриваются как олигонуклеотидные мотивы и последовательности, которые связываются с другими олигонуклеотидами или белками, так и аминокислотные мотивы или последовательности.

Промоторы

Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут включать промоторные последовательности или промоторы, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид по настоящему изобретению. В настоящем документе «промотор» относится к контрольной области последовательности нуклеиновой кислоты, в которой контролируются инициация и скорость транскрипции

оставшейся части последовательности нуклеиновой кислоты. Промотор также может содержать субобласти, с которыми могут связываться регуляторные белки и молекулы, такие как РНК-полимераза и другие факторы транскрипции. По меньшей мере, один модуль в промоторе определяет место начала синтеза РНК. Наиболее известным примером этого является ТАТА-бокс, но в некоторых промоторах, лишенных ТАТА-бокса, таких как промотор гена концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы млекопитающих и промотор поздних генов SV40, дискретный элемент, лежащий перед стартовым сайтом, помогает фиксировать точку инициации.

Дополнительные элементы промотора регулируют частоту инициации транскрипции. Обычно они расположены в области 30-110 п.н. выше стартового сайта, хотя было показано, что ряд промоторов содержат функциональные элементы ниже стартового сайта. Интервал между элементами промотора часто является гибким, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертированы или перемещены относительно друг друга. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать совместно или независимо для активации транскрипции.

Промоторы могут быть конститутивными, индуцируемыми, активируемыми, репрессируемыми, тканеспецифичными или любой их комбинацией. Промотор управляет экспрессией или транскрипцией последовательности нуклеиновой кислоты, которую он регулирует. В настоящем документе промотор считается «функционально связанным», когда он находится в правильном функциональном положении и ориентации по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, которую он регулирует для контроля («управления») инициации транскрипции и/или экспрессии этой последовательности. Термин «функционально связанный» используется в настоящей заявке взаимозаменяемо с терминами «функционально расположенный», «под контролем» и «под транскрипционным контролем».

Промотор можно классифицировать как сильный или слабый в зависимости от его аффинности к РНК-полимеразе (и/или сигма-фактору); это связано с тем, насколько близко последовательность промотора напоминает идеальную консенсусную последовательность полимеразы. Сила промотора может зависеть от того, происходит ли инициация транскрипции на этом промоторе с высокой или низкой частотой. По желанию можно использовать разные промоторы с разной силой.

Подходящие промоторные последовательности могут быть природными или синтетическими. Например, они могут быть естественным образом связаны с геном или последовательностью, что можно получить путем выделения 5'-некодирующих

последовательностей, расположенных выше кодирующего сегмента данного гена или последовательности. Такой промотор можно назвать «эндогенным». Аналогично, активатор/энхансер может быть активатором, естественным образом связанным с последовательностью нуклеиновой кислоты и расположенным внутри, ниже или выше этой последовательности.

В некоторых воплощениях кодирующий сегмент нуклеиновой кислоты может быть расположен под контролем рекомбинантного или гетерологичного промотора, который относится к промотору, который обычно не связан с кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты в ее природном окружении. Рекомбинантный или гетерологичный энхансер относится к энхансеру, который обычно не связан с последовательностью нуклеиновой кислоты в его природном окружении. Такие промоторы или энхансеры могут включать промоторы или энхансеры других генов; промоторы или энхансеры, выделенные из любой подходящей эукариотической или прокариотической клетки; и синтетические промоторы или энхансеры, которые не являются «встречающимися в природе», например, те, которые содержат разные элементы разных областей регуляции транскрипции и/или мутации, которые изменяют экспрессию с помощью методов генной инженерии. Помимо синтетического получения последовательностей нуклеиновых кислот промоторов и энхансеров, последовательности можно получать с использованием технологии рекомбинантного клонирования и/или амплификации нуклеиновых кислот, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

В некоторых воплощениях промотор может быть конститутивным промотором. Под конститутивным промотором специалист понимает промотор, экспрессия которого постоянна в стандартных условиях культивирования, т.е. промотор, который экспрессирует генный продукт по существу на постоянном уровне экспрессии.

В альтернативных воплощениях промотор может представлять собой индуцируемый (условный) промотор. В настоящем документе «индуцируемый промотор» представляет собой промотор, который характеризуется иницированием или усилением транскрипционной активности в присутствии индуктора или индуцирующего агента, под его влиянием или при контакте с ним. «Индуктор» или «индуцирующий агент» может быть эндогенным или обычно экзогенным состоянием, соединением или белком, который контактирует с промотором или транскрипционным аппаратом таким образом, чтобы быть активным в индукции транскрипционной активности индуцируемого промотора. Индуцируемые промоторы и, более конкретно, бактериальные индуцируемые промоторные системы были очень подробно описаны в данной области техники (например, в Brautaset et al., Positively regulated bacterial expression systems, *Microbial*

biotechnology, 2009).

Индукцируемые промоторы для использования в соответствии с настоящим изобретением действуют в микробной клетке, такой как бактериальная клетка. Примеры индуцируемых промоторов для использования в настоящей заявке включают, без ограничения указанным, промоторы бактериофагов (например, P_{lslcon}, T3, T7, SP6, PL) и бактериальные промоторы (например, P_{bad}, P_{mgrB}, P_{trc2}, P_{lac/ara}, P_{tac}, P_m) или их гибриды (например, P_{LlacO}, P_{LtetO}). Примеры бактериальных промоторов для использования в соответствии с настоящим раскрытием включают, без ограничения указанным, положительно регулируемые промоторы *E. coli*, такие как положительно регулируемые промоторы $\sigma 70$ (например, индуцируемый промотор p_{Bad/araC}, правый промотор кассеты Lux, модифицированный промотор λ Prm, p_{lac} Or2 -62 (положительный), p_{Bad/AraC} с дополнительными сайтами REN, p_{Bad}, P(Las) TetO, P(Las) CIO, P(Rhl), P_u, FecA, pRE, cadC, hns, pLas, pLux), в качестве промоторов (например, P_{dps}), промоторы $\sigma 32$ (например, теплового шока) и промоторы $\sigma 54$ (например, glnAp2); отрицательно регулируемые промоторы *E. coli*, такие как отрицательно регулируемые промоторы $\sigma 70$ (например, промотор (PRM⁺), модифицированный промотор λ Prm, TetR-TetR-4C P(Las) TetO, P(Las) CIO, P(Lac) IQ, RecA_DlexO_DLac01, dapAp, FecA, Pspac-hy, pel, plux-cl, plux-lac, CinR, CinL, контролируемый глюкозой, модифицированный Pr, модифицированный Prm⁺, FecA, P_{cytA}, Rec A (SOS), Rec A (SOS), EmrR_regulated, Betl_regulated, pLac_lux, pTet_Lac, pLac/Mnt, pTet/Mnt, LsrA/cI, pLux/cI, LacI, LacIQ, pLacIQI, pLas/cI, pLas/Lux, pLux/Las, pRecA с сайтом связывания LexA, обратный ВВa_R0011, pLacI/ ara-1, pLacIq, rrmB PI, cadC, hns, Pfhua, pBad/araC, nhaA, OmpF, RcnR), промоторы σS (например, Lutz-Bujard LacO с альтернативным сигма-фактором $\sigma 38$), промоторы $\sigma 32$ (например, Lutz-Bujard LacO с альтернативными промоторами сигма-фактора $\sigma 32$) и $\sigma 54$ (например, glnAp2); отрицательно регулируемые промоторы *B. subtilis*, такие как репрессуемые промоторы σA *B. subtilis* (например, грамположительные, индуцируемые IPTG, Xyl, hyper-spank) и промоторы σ . Другие индуцируемые микробные промоторы и/или бактериальные промоторы могут быть использованы в соответствии с настоящим раскрытием.

Индукцируемый промотор для применения в соответствии с настоящим раскрытием может индуцироваться (или подавляться) одним или более физиологическими условиями, такими как изменения pH, температуры, радиации, осмотического давления, градиентов физиологического раствора, связывания с клеточной поверхностью и концентрации одного или более внешних или внутренних индуцирующих агентов. Внешний индуктор или индуцирующий агент может включать, без ограничения указанным, аминокислоты и

аналоги аминокислот, сахараиды и полисахариды, нуклеиновые кислоты, белковые активаторы и репрессоры транскрипции, цитокины, токсины, соединения на основе нефти, металлсодержащие соединения, соли, ионы, аналоги субстратов ферментов, гормоны или их комбинации.

Индукцируемые промоторы для использования в соответствии с настоящим раскрытием включают любой индуцируемый промотор, описанный в настоящей заявке или известный специалисту в данной области. Примеры индуцируемых промоторов включают, без ограничения указанным, химически/биохимически регулируемые и физически регулируемые промоторы, такие как промоторы, регулируемые спиртом, промоторы, регулируемые тетрациклином (например, промоторы, чувствительные к ангидротетрациклину (aTc), и другие системы промоторов, чувствительные к тетрациклину, которые включают белок-репрессор тетрациклина (tetR), последовательность оператора тетрациклина (tetO) и гибридный белок трансактиватора тетрациклина (tTA)), стероид-регулируемые промоторы (например, промоторы на основе крысиного глюкокортикоидного рецептора, человеческого рецептора эстрогена, рецепторов экдизона мотылька и промоторов из суперсемейства стероидных/ретиноидных/тиреоидных рецепторов), металл-регулируемые промоторы (например, промоторы, полученные из генов металлотионеина (белков, которые связывают и изолируют ионы металлов) дрожжей, мыши и человека), патоген-регулируемые промоторы (например, индуцируемые салициловой кислотой, этиленом или бензотиадиазолом (BTH)), промоторы, индуцируемые температурой/теплом (например, промоторы теплового шока) и светорегулируемые промоторы (например, светочувствительные промоторы из растительных клеток). В некоторых воплощениях промотор представляет собой промотор TetR, являющийся частью системы Tet-On или Tet-off (Krueger et al., Tetracycline derivatives: alternative effectors for Tet transregulators, *Biotechniques*, 2004; and Loew et al., Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression, *BioMedCentral Biotechnology*, 2010).

Подходящие промоторные последовательности для экспрессии в бактериях *Mycoplasma* включают, без ограничения указанным, промотор P3 (48) и синтетический промотор pSynL. Другие промоторы были успешно использованы в области *Mycoplasma*, например, промотор SynMyco (<https://doi.org/10.1093/dnares/dsz012>) или другие промоторы, используемые в промежуточных версиях, полученных из транспозона Tn4001 (10.1007/BF00382099).

Другие промоторы для использования в соответствии с настоящим изобретением могут включать любой подходящий промотор из любого бактериального, вирусного или

эукариотического источника; в частности, для экспрессии в *Lactococcus lactis* или *E.coli*.

В различных других воплощениях, где клетка-мишень представляет собой клетку млекопитающего, промотор немедленно-раннего гена цитомегаловируса человека (CMV), ранний промотор SV40 и длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса можно использовать для получения экспрессии трансгенов на высоком уровне. Также рассматривается использование других промоторов вирусов или клеток млекопитающих, или бактериофагов, которые хорошо известны в данной области техники, для достижения экспрессии трансгена, при условии, что уровни экспрессии достаточны для данной цели.

Энхансеры

В некоторых воплощениях настоящего раскрытия промотор может использоваться или не использоваться в сочетании с «энхансером», который также участвует в активации транскрипции. Энхансер представляет собой одну или более областей ДНК, которые могут связываться с белками (а именно, транс-действующими факторами) для повышения уровня транскрипции гена. Энхансер может располагаться в функциональной области выше или ниже промотора. Хотя обычно он находится на 5'-конце кодирующей области, он также может быть отделен от последовательности промотора, например может находиться внутри интронной области гена или на 3'-конце от кодирующей области гена.

Терминаторы

В некоторых воплощениях полинуклеотид по настоящему изобретению может содержать терминаторную последовательность или терминатор. Терминатор в настоящей заявке представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая вызывает остановку транскрипции. Терминатор может быть однонаправленным или двунаправленным. Он состоит из последовательности ДНК, участвующей в специфической терминации транскрипта РНК РНК-полимеразой. Последовательность терминатора предотвращает транскрипционную активацию нижестоящих последовательностей нуклеиновых кислот с помощью вышестоящих промоторов. Таким образом, в некоторых воплощениях рассматривается терминатор, который прекращает продукцию транскрипта РНК. Терминатор может быть необходим *in vivo* для достижения желаемых уровней экспрессии генов/белков.

Наиболее часто используемый тип терминатора — прямой терминатор. Помещенный ниже последовательности нуклеиновой кислоты, которая обычно транскрибируется, прямой терминатор транскрипции вызывает прерывание транскрипции. В некоторых воплощениях предусмотрены двунаправленные терминаторы транскрипции, которые обычно вызывают терминацию транскрипции как на прямой, так и на обратной цепи. В некоторых воплощениях включены терминаторы обратной транскрипции,

которые обычно терминируют транскрипцию только на обратной цепи. В прокариотических системах терминаторы обычно делятся на две категории: (i) Rho-независимые терминаторы; и (ii) Rho-зависимые терминаторы. Rho-независимые терминаторы обычно состоят из палиндромной последовательности, которая образует петлю стебля, богатую парами оснований G-C, за которой следует цепочка оснований урацила.

Терминаторы для использования в соответствии с настоящим раскрытием включают любой терминатор транскрипции, описанный в настоящей заявке или известный специалисту в данной области. Примеры терминаторов включают, без ограничения, последовательности терминации генов, такие как, например, терминатор бычьего гормона роста, и последовательности терминации вируса, такие как, например, терминатор TO, терминатор TE, лямбда-T1 и терминатор T1T2, обнаруженный в бактериальных системах. В некоторых воплощениях сигнал терминации может представлять собой последовательность, которая не может быть транскрибирована или транслирована, например, полученная в результате укорачивания последовательности.

Другие генетические элементы известны в данной области и могут быть использованы в соответствии с настоящим раскрытием.

Экспрессирующие векторы

Любой подходящий полинуклеотид по настоящему изобретению может быть частью экспрессирующего вектора, такого как плаزمид, необязательно нерепликативная плаزمид, фагмида, бактериофаг, вектор, полученный из бактериофага, искусственная хромосома, миникольцо, лентивирусный вектор, ретровирусный вектор, аденовирусный или аденоассоциированный вирусный вектор, вектор piggyBack или вектор tol2. Квалифицированному специалисту известны эти различные типы конструкций, и их создание и манипуляции подробно описаны во многих случаях (Sambrook et al., *Molecular cloning: a laboratory manual*, ISBN 0879693096, 1989 and the corresponding updated 4th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012). Кроме того, для специалиста в данной области техники очевидно, что плазмидная ДНК или (кольцевая) рекомбинантная ДНК в данной области техники обычно называется копией ДНК, комплементарной ДНК или аббревиатурой «кДНК», каждая из которых может использоваться взаимозаменяемо.

Термин «экспрессирующий вектор» или «экспрессирующая конструкция» означает любой тип генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую генный продукт, в которой часть или вся последовательность, кодирующая нуклеиновую кислоту, способна транскрибироваться. Транскрипт может быть транслирован в белок, но это не обязательно. Таким образом, в некоторых воплощениях экспрессия включает как

транскрипцию гена, так и трансляцию РНК в генный продукт.

Особенно полезными векторами считаются те векторы, в которых кодирующая часть сегмента ДНК, кодирующая полноразмерный белок или меньший полипептид, расположена под транскрипционным контролем промотора, как описано выше.

Естественно, будет важно использовать промотор, который эффективно направляет экспрессию полипептида по настоящему раскрытию в типе клеток или организме, выбранном для экспрессии. Использование комбинаций промоторов и типов клеток для экспрессии белка обычно известно специалистам в области молекулярной биологии, например, см. Sambrook et al. (1989), включенной в настоящий документ посредством ссылки. В векторе или плазмиде по настоящему раскрытию можно использовать любой подходящий промотор, который определяет желаемый уровень экспрессии кодируемого полипептида.

Считается, что конкретный промотор, который используется для контроля экспрессии нуклеиновой кислоты, не имеет решающего значения, при условии, что он способен экспрессировать желаемый полипептид на желаемом уровне в клетке-мишени или организме. Таким образом, при использовании *Mycoplasma* может оказаться предпочтительным расположить кодирующую полинуклеотидную область по соседству и под контролем промотора, который способен экспрессироваться в *Mycoplasma*. Аналогичным образом, если желательно экспрессировать полипептид в *E.coli* или *L.lactis*, следует использовать соответствующий промотор, подходящий для экспрессии в *E.coli* или *L.lactis*.

При создании рекомбинантных бактерий или других клеток может быть полезно включить один или более «репортерных генов». Обычно репортерные гены кодируют полипептид, который иначе не вырабатывается клеткой-хозяином; или белок или фактор, продуцируемый клеткой-хозяином, но на гораздо более низких уровнях; или мутантную форму полипептида, не продуцируемую клеткой-хозяином иным образом. Репортерный ген может кодировать фермент, который вызывает калориметрические или флуорометрические изменения в клетке-хозяине, которые выявляются с помощью анализа *in situ* и представляют собой количественную или полуколичественную функцию активации транскрипции. Типичные репортерные гены кодируют эстеразы, фосфатазы, протеазы и другие белки, детектируемые по активности, которые генерируют хромофор или флуорофор, как известно специалисту в данной области. Хорошо известными примерами такого репортерного гена являются β -галактозидаза, люцифераза и хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT) *E. coli*. Альтернативно, репортерный ген может кодировать маркер селекции, например, придавая клетке-хозяину устойчивость к агенту

селекции. Например, ген *neo* делает клетки устойчивыми к антибиотику неомизин. Предполагается, что практически любая система клетки-хозяина, совместимая с кассетой репортерного гена, может быть использована для определения регуляторной единицы. Таким образом, можно использовать клетки млекопитающих или других эукариот, клетки насекомых, бактерий или растений.

Для эффективной трансляции кодирующих последовательностей также может потребоваться специфический сигнал инициации. Эти сигналы включают в себя иницирующий кодон ATG и соседние последовательности. Возможно, потребуется предоставить экзогенные сигналы контроля трансляции, включая иницирующий кодон ATG. Специалист в данной области техники легко сможет определить это и обеспечить необходимые сигналы. Хорошо известно, что иницирующий кодон должен находиться «в рамке» с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности, чтобы гарантировать трансляцию всей вставки. Кроме того, хорошо известно, что некоторые бактерии способны использовать альтернативные (не-ATG) стартовые сайты, и, таким образом, также предполагаются сигналы инициации, включающие такие альтернативные сайты. Экзогенные сигналы контроля трансляции и иницирующие кодоны могут быть как природными, так и синтетическими. Эффективность экспрессии может быть повышена путем включения соответствующих элементов энхансеров транскрипции.

Используемые в настоящей заявке термины «сконструированные» и «рекомбинантные» клетки предназначены для обозначения клетки, в которую был введен экзогенный сегмент ДНК или ген, такой как полинуклеотид, кодирующий полипептиды (фолдикины) по настоящему изобретению. Следовательно, сконструированные клетки отличаются от встречающихся в природе клеток, которые не содержат рекомбинантно введенного экзогенного сегмента ДНК или гена. Рекомбинантные клетки включают те, которые имеют введенную кДНК или геномный ген, а также включают гены, расположенные рядом с промотором, который в природе не связан с конкретным введенным геном.

Для экспрессии полипептида фолдикина по настоящему изобретению можно получить экспрессирующий вектор, который содержит полинуклеиновую кислоту, кодирующую фолдикин, под контролем одного или более промоторов. Чтобы поставить кодирующую последовательность «под контроль» промотора, 5'-конец сайта инициации транскрипции транскрипционной рамки считывания обычно располагают между около 1 и около 50 нуклеотидами ниже (т.е. в 3'-области) выбранного промотора. Вышестоящий промотор стимулирует транскрипцию ДНК и способствует экспрессии кодируемого полипептида. Один или более энхансерных элементов также могут быть связаны с

экспрессирующей конструкцией.

Доступно множество стандартных методов конструирования экспрессирующих векторов, содержащих соответствующие нуклеиновые кислоты и последовательности контроля транскрипции/трансляции, чтобы добиться экспрессии белка или полипептида в различных системах экспрессии хозяина. Типы клеток, доступные для экспрессии, включают, без ограничения указанным, бактерии, такие как *M. pneumoniae*, *E. coli*, *L. Lactis*, *S. aureus* и *B. subtilis*, трансформированные экспрессирующими векторами рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК.

Обычно в отношении этих хозяев используют плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, полученные от видов, совместимых с клеткой-хозяином. Вектор обычно несет сайт репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечивать фенотипическую селекцию в трансформированных клетках. Например, *E. coli* часто трансформируют с использованием производных pBR322, плазмиды, полученной из видов *E. coli*. pBR322 содержит гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину и, таким образом, обеспечивает простые средства идентификации трансформированных клеток. Плазида pBR или другая микробная плазида или фаг также должна содержать или быть модифицирована для содержания промоторов, которые могут использоваться микробным организмом для экспрессии его собственных белков.

Микоплазмы, как правило, испытывают трудности с поддержанием репликативных векторов. Однако можно использовать транспозоны, полученные из вектора Tn4001 (с разными маркерами устойчивости). Транспозон содержит транспозазу, расположенную вне пары инвертированных повторов. Экзогенная последовательность ДНК, которая может быть вставлена в хромосому, помещается в инвертированные повторы. После того, как вектор встроен в клетку, транспозаза катализирует удаление инвертированных повторов и случайным образом вводит внутреннюю последовательность в хромосому. Следовательно, в хромосому *M. pneumoniae* могут быть введены кусочки экзогенной ДНК разной длины.

Кроме того, в качестве трансформирующих векторов в связи с этими хозяевами можно использовать фаговые векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, совместимые с микроорганизмом-хозяином. Например, фаг лямбда GEM™-11 можно использовать для создания рекомбинантного фагового вектора, который можно использовать для трансформации клеток-хозяев, таких как *M. pneumoniae* и *E. coli*.

Другие полезные векторы включают векторы pIN (Inouye and Inouye, 1985); Векторы pQE (His-меченные) (Qiagen) и векторы pGEX для использования в создании

растворимых слитых белков глутатион-S-трансферазы (GST) для последующей очистки, разделения или расщепления. Другими подходящими слитыми белками являются белки с β -галактозидазой, убиквитином и т.п.

Предполагается, что полипептид по настоящему изобретению может экспрессироваться в гетерологичных системах, таких как бактерии, в которых цитокины обычно не экспрессируются; или в некоторых случаях может экспрессироваться в эукариотических клетках, таких как клетки человека.

В некоторых воплощениях полинуклеотид по настоящему изобретению может содержать бицистронную экспрессирующую конструкцию. В дополнительных воплощениях полинуклеотид включен, т.е. встроен, в клеточный геном, предпочтительно в геномную последовательность бактерий, таких как *M. pneumoniae*, *L. Lactis* или *E. coli*. В некоторых воплощениях полинуклеотид может быть частью клеточного генома, например, клеточный геном, созданный de novo, или подвергнутый мутагенезу или синтетический бактериальный геном. В дополнительных воплощениях нуклеотидное расположение содержится в бактериальной искусственной хромосоме или искусственной хромосоме дрожжей.

В некоторых воплощениях полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть включены в генетически модифицированный штамм *Mycoplasma*, такой как аттенуированный штамм CV2 (Δ mpn133, Δ mpn372) (58) или CV8 на основе CV2, в котором ген mpn051 заменен геном *gpsA*. из *Mycoplasma penetrans*. Эти полинуклеотиды также можно оценить в других представляющих интерес микоплазмах.

В некоторых воплощениях полинуклеотиды по настоящему изобретению могут содержаться в бактериофаге. Термин «бактериофаг», описанный в настоящей заявке, указывает на вирус, который инфицирует и, необязательно, способен реплицироваться внутри бактерий и архей, который может быть модифицирован для терапевтических целей, как описано в данной области техники (например, Principi et al., Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections, *Frontiers in Pharmacology*, 2019).

В дополнительных воплощениях цепочка различных элементов последовательности (например, полинуклеотидов по настоящему изобретению) может рассматриваться как «оперон». «Оперон», используемый в настоящей заявке, относится к функциональной единице ДНК, содержащей кластер генов, в котором все гены контролируются одним промотором. Таким образом, обычно гены оперона транскрибируются совместно. Транскрибируемые гены оперона транскрибируются в одну цепь мРНК и могут быть либо вместе транслированы в цитоплазме, либо сращены с образованием моноцистронных

мРНК, которые можно транслировать отдельно.

Векторы и плазмиды по настоящему изобретению обычно также включают «начало репликации» или «ORI», которое относится к последовательности, в которой инициируется репликация либо в прокариотических, либо в эукариотических организмах. Репликация ДНК может происходить из этой точки двунаправленно или однонаправленно. Обычно используемые прокариотические источники происхождения или репликации включают, без ограничения указанным, pMB1, модифицированный pMB1, pBR322, ColE1, производное ColE1, FI, R6K, pl5A, pSC101 и pUC.

Для того чтобы полинуклеотид можно было вставить и клонировать, т.е. размножить, вектор обычно содержит один или более уникальных сайтов рестрикции и может быть способен к автономной репликации в определенной клетке или организме-носителе, так что клонированная последовательность является воспроизводимой. Как отмечалось выше, такой вектор может также содержать маркер селекции, такой как, например, ген устойчивости к антибиотику, чтобы обеспечить возможность отбора клеток-реципиентов, содержащих вектор, как отмечено выше.

Экспрессированные полипептиды

В воплощениях полипептиды по настоящему раскрытию – кодируемые полинуклеотидами по настоящему изобретению – могут содержать «сигнал презентации» или «сигнал воздействия» и/или «сигнал секреции». Соответственно, полинуклеотиды по настоящему изобретению могут содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более таких последовательностей.

Термин «сигнал презентации» или «сигнал экспонирования» относится к пептидной последовательности, которая нацелена на гибридный/связанный пептид (например, фолдикин по настоящему изобретению) для экспонирования на клеточной мембране. По желанию клетка может представлять собой бактериальную клетку или эукариотическую клетку. Под «экспонированным» или «презентированным» подразумевается, что представляющий интерес полипептид все еще физически прикреплен к клетке, в которой он был продуцирован, предпочтительно к внешней клеточной поверхности клетки. Последовательности сигналов экспонирования известны специалистам. В воплощениях сигнальная последовательность экспонирования представляет собой последовательность, встречающуюся в природе у бактерий, таких как *E.coli*, *L.lactis* или *Mycoplasma* (например, *M.pneumoniae*). В некоторых воплощениях сигнальная последовательность экспонирования представляет собой бактериальную последовательность не природного происхождения.

Термин «сигнал секреции», используемый в настоящей заявке, относится к

пептидной последовательности, провоцирующей или опосредующей секрецию полипептида из клетки, в которой он экспрессировался. Таким образом, в отличие от того, когда полипептид экспонирован или представлен, секретлируемый полипептид, содержащий сигнал секреции, больше не связан физически с клеткой, в которой он продуцировался, так что он может секретироваться во внеклеточное пространство.

В воплощениях сигнальная последовательность секреции может представлять собой последовательность, встречающуюся в природе у бактерий, таких как *E.coli*, *L.lactis* или *Mycoplasma*. В альтернативных воплощениях сигнальная последовательность секреции представляет собой бактериальную последовательность неприродного происхождения. Сигналы секреции микоплазмы описаны, например, в международной заявке на патент WO2016/135281. В воплощениях конкатенированные сигналы секреции могут использоваться для усиления секреции полипептида; например, разные сигналы секреции могут быть включены в разные места полипептида согласно раскрытию.

В различных воплощениях после того, как белок был экспонирован на поверхности клетки (т.е. представлен) или после того, как белок был секретирован, сигнальная последовательность может быть удалена из связанного белка путем протеолитического расщепления. В некоторых воплощениях сигнальная последовательность экспонирования или секреции расположена на N-конце полипептида.

Заболевания и расстройства

Агенты, композиции, способы и применения по настоящему изобретению могут быть особенно подходящими для лечения широкого спектра заболеваний и расстройств, включая, например, любое заболевание или расстройство, для которого было бы полезно уменьшение или увеличение воспалительной реакции или степени пролиферации клеток. В частности, заболевания и расстройства, которые можно лечить в соответствии с изобретением, включают рак и/или пролиферативные или онкологические заболевания (особенно солидные опухоли) и воспалительные заболевания или расстройства. Кроме того, настоящее изобретение может быть пригодным для лечения инфекционных заболеваний или для стимулирования регенерации тканей после повреждения ткани или заболевания.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что пролиферативные заболевания могут быть связаны с: (1) патологической пролиферацией обычно покоящихся или нормально пролиферирующих клеток; (2) патологической миграцией клеток из их нормального местоположения (например, метастазы неопластических клеток); (3) патологической экспрессией протеолитических ферментов, таких как матриксные металлопротеиназы (например, коллагеназы, желатиназы и эластазы), которая

может привести к нежелательному обновлению клеточного матрикса; и/или (4) патологическим ангиогенезом, который возникает при пролиферативной ретинопатии и метастазах опухоли. Типичные пролиферативные заболевания включают рак, доброкачественные новообразования и ангиогенез, который сопровождает и содействует болезненному состоянию (определенное выше как патологический ангиогенез).

Композиции, агенты, способы и применения по настоящему изобретению могут оказывать благоприятное воздействие при лечении широкого спектра пролиферативных заболеваний и расстройств и/или уменьшении их симптомов; например, предотвращая клеточную пролиферацию и особенно способствуя гибели патогенных клеток.

Изобретение может быть применимо при различных типах рака и/или оказывать благоприятное воздействие на прогрессирование опухоли (например, обращая вспять прогрессирование опухоли) *in vivo* и/или *in vitro*. В частности, изобретение может быть полезно при лечении рака легкого (в частности, аденокарциномы легких), рака шейки матки, рака молочной железы, рака сердца, рака ободочной кишки, рака предстательной железы, глиобластомы головного мозга, рака поджелудочной железы, лейкоза (например, острого моноцитарного лейкоза), лимфомы, рака почки, колоректального рака, рака мочевого пузыря, рака яичка, рака желудочно-кишечного тракта, рака печени (например, гепатокарциномы) и/или глиобластомы. Изобретение также может быть полезно при лечении одного или более из числа рака кожи (например, меланомы), рака головы и/или шеи, рака желчного пузыря, рака матки, рака желудка, рака щитовидной железы, рака гортани, рака губы и/или полости рта, рака горла, рака глаз и рака костей.

В некоторых конкретных воплощениях рак может быть выбран из любой одной или нескольких групп, состоящих из острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), аденокарциномы, СПИД-ассоциированной лимфомы, первичной лимфомы ЦНС, анального рака, рака аппендикса, астроцитомы, атипичной тератоидной/рабдоидной опухоли, базальноклеточной карциномы, рака желчных протоков, внепеченочного рака, семейства сарком Юинга, остеосаркомы и злокачественной фиброзной гистиоцитомы, эмбриональных опухолей центральной нервной системы, герминогенных опухолей центральной нервной системы, краниофарингиомы, эпендимомы, бронхиальных опухолей, лимфом Беркитта, карциноидной опухоли, первичной лимфомы, хордомы, хронических миелолиферативных новообразований, рака ободочной кишки, рака внепеченочных желчных протоков, протоковой карциномы *in situ* (DCIS), рака эндометрия, эпендимомы, рака пищевода, эстезионейробластомы, экстракраниальной герминогенной опухоли,

внегонадной герминогенной опухоли, рака фаллопиевой трубы, фиброзной гистиоцитомы кости, желудочно-кишечной карциноидной опухоли, желудочно-кишечных стромальных опухолей (GIST), герминогенной опухоли яичка, гестационной трофобластической болезни, глиомы ствола головного мозга у детей, волосатоклеточного лейкоза, гепатоцеллюлярного рака, гистиоцитоза клеток Лангерганса, лимфомы Ходжкина, гипофарингеального рака, опухоли островковых клеток, нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы, опухоли Вильмса и других опухолей почек у детей, гистиоцитоза клеток Лангерганса, мелкоклеточного рака легкого, кожной Т-клеточной лимфомы, внутриглазной меланомы, карциномы клеток Меркеля, мезотелиомы, метастатического плоскоклеточного рака шеи, карциномы среднего отдела, синдромов множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы/новообразования плазматических клеток, миелодиспластических синдромов, рака полости носа и околоносовых пазух, рака носоглотки, нейробластомы, неходжкинской лимфомы (NHL), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), эпителиального рака яичников, герминогенного рака яичников, рака яичников с низким потенциалом злокачественности, нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы, папилломатоза, параганглиомы, рака околоносовых пазух и полости носа, рака паращитовидной железы, рака полового члена, рака глотки, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, плеврорлегочной бластомы, первичного рака брюшины, рака прямой кишки, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака слюнной железы, саркомы Капоши, рабдомиосаркомы, синдрома Сезари, рака тонкого кишечника, саркомы мягких тканей, рака горла, тимомы и карциномы тимуса, рака щитовидной железы, переходноклеточного рака почечной лоханки и мочеточника, рака уретры, рака эндометрия матки, саркомы матки, рака влагалища, рака вульвы и макроглобулинемии Вальденстрема.

Кроме того, это описание также охватывает терапевтическое применение терапевтических агентов и композиций по изобретению, а также способы ингибирования или предотвращения местной инвазивности или метастазирования, или того и другого, любого типа первичного рака. Например, первичным раком может быть меланома, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак легкого, гепатокарцинома, ретинобластома, астроцитомы, глиобластома, рак десны, рак языка, лейкоз, нейробластома, рак головы, рак шеи, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак кости, рак яичек, рак яичников, мезотелиома, рак шейки матки, рак желудочно-кишечного тракта, лимфома, рак головного мозга, рак толстой кишки или рак мочевого пузыря. В некоторых воплощениях первичный рак может представлять собой рак печени. Например, рак печени может представлять

собой гепатоцеллюлярную карциному (НСС) и/или метастазы в печень.

Более того, настоящее изобретение можно использовать для предотвращения рака или лечения предраковых состояний или предзлокачественных клеток, включая метаплазию, дисплазию и гиперплазию. Изобретение также можно использовать для ингибирования нежелательных, но доброкачественных клеток, таких как плоскоклеточная метаплазия, дисплазия, клетки доброкачественной гиперплазии предстательной железы, гиперпластические поражения и т.п. В некоторых воплощениях прогрессирование до рака или до более тяжелой формы рака можно остановить, прервать или отсрочить с помощью применений и способов настоящего раскрытия, включающих раскрытые в настоящей заявке терапевтические агенты.

Таким образом, изобретение относится к агентам и композициям для применения в медицине и, в частности, для применения при лечении рака, выбранного из рака легкого (в частности, аденокарциномы легких или плоскоклеточного рака легких), рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака молочной железы, рака ободочной кишки, глиобластомы головного мозга, рака поджелудочной железы, острого моноцитарного лейкоза, рака почки, колоректального рака, рака кожи (например, меланомы), рака желудка, рака щитовидной железы, рака кости и рака печени. Также предложены способы лечения таких заболеваний. Применение и способы могут включать введение агентов по изобретению пациенту, нуждающемуся в этом.

Композиции и агенты по настоящему изобретению также могут быть полезны при иммунотерапии рака и/или при иммуноонкологическом лечении.

Воспаление

Параллельно воспалительная реакция является адаптивной реакцией на различные повреждения: физические, химические или биологические. Существуют различные типы воспаления: классическое воспаление, гомеостатическое воспаление, вялотекущее воспаление, адаптивный ответ на стресс, известный как паравоспаление, или метаболически-спровоцированное воспаление. «Фолдикины» согласно настоящему раскрытию можно использовать для лечения воспалительных заболеваний, например, в том случае, когда иммунная система ошибочно атакует клетки или ткани собственного организма. Сопутствующих состояний таких иммунологических заболеваний или расстройств множество и они включают боль, покраснение, отек, скованность или повреждение других/соседних здоровых тканей. В изобретении предложены агенты и композиции для применения в медицине и, в частности, для применения при лечении аллергии, астмы, аутоиммунных заболеваний, целиакии, гломерулонефрита, гепатита, воспалительного заболевания кишечника, переперфузионного повреждения, отторжения

трансплантата, диабета, болезни Альцгеймера, остеоартрита, фибромиалгии, мышечной боли в пояснице, артрита, мышечной боли в шее, миокардита, анкилозирующего спондилита (AS), синдрома антифосфолипидных антител (APS), миозита, ревматоидного артрита, склеродермии, синдрома Шегрена, фиброза.

Вирусные, бактериальные и грибные инфекции

«Фолдикины» по настоящему раскрытию могут быть полезны при лечении вирусных, бактериальных или грибных инфекций. Любые такие микроорганизмы могут вызывать воспалительные реакции и высвобождение физиологических агентов, которые изменяют иммунную систему. В других случаях такие инфекционные агенты могут продуцировать и выделять токсины. Чтобы уравновесить реакцию иммунной системы, фолдикины также можно применять при краснухе, розеоле, оспе, вирусной инфекции чикунгуя, кори, норовирусной инфекции, коронавирусной инфекции, опоясывающем лишае, гепатите, герпесе, лихорадке денге, Эболе, лихорадке Ласса, геморрагической марбургской лихорадке, полиомиелите, менингите, энцефалите или бешенстве.

Поскольку цитокины также играют ключевую роль в организации иммуноопосредованного клеточного восстановления и регенеративных реакций, настоящее изобретение также может обеспечить дополнительные преимущества в ускорении восстановления тканей после повреждений, связанных с такими инфекциями и инфекционными агентами.

Регенерация тканей

Иммунная система играет центральную роль в восстановлении и регенерации тканей. Иммунный ответ на повреждение тканей имеет решающее значение для определения скорости и исхода процесса заживления и восстановления функции органа. Таким образом, контроль иммунных компонентов с помощью цитокинов является привлекательным подходом в регенеративной медицине. Таким образом, фолдикины по настоящему изобретению также могут найти применение в способах и терапевтическом применении для регенерации тканей, например, способствуя пролиферации и дифференцировке правильных клеток и предотвращая фиброз. Примерами такого применения являются лечение таких состояний, как колит, заживление ран, рост волос, регенерация печени и синтез матрикса.

Композиции, агенты, способы и применения по настоящему изобретению могут принести пользу при лечении любого или всех таких заболеваний и расстройств.

Терапевтические композиции

Одноцепочечный димерный цитокин, полинуклеотид или сконструированный бактериофаг, рекомбинантные бактерии или клетки (например, «терапевтические

агенты») по изобретению могут быть включены в фармацевтическую композицию для применения при лечении животного; желателен человек. Терапевтический агент по изобретению (или его производное) можно использовать для лечения одного или более заболеваний или инфекций, в зависимости от активности/свойств одноцепочечного димерного цитокина по изобретению. В различных воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический пептид, может быть встроена в экспрессирующую конструкцию/вектор – в частности, бактериофаговый вектор, вирусный или бактериальный геном – и включена в фармацевтические составы/лекарственные средства для той же цели. Таким же образом фолдикины по настоящему изобретению можно доставлять обычными способами доставки, такими как аэрозоли, интрацефальное введение, инъекции, суппозитории и т. д., или можно вводить рекомбинантными способами.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, потенциальные терапевтические агенты, например, согласно настоящему раскрытию, могут быть протестированы на животной модели, такой как кролик или мышь, прежде чем они могут быть одобрены для применения у человека. Соответственно, полипептиды, бактериофаги, бактерии или клетки по настоящему изобретению могут экспрессироваться или доставляться *in vivo* кроликам или мышам или *ex vivo* в клетки кролика или мыши, а также человеку/в клетки человека. В соответствии с изобретением подходящие экспрессирующие кассеты и экспрессионные конструкции/векторы могут быть спроектированы специально для каждой животной системы.

Терапевтические пептиды и нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть особенно пригодны для лечения заболеваний, состояний и/или инфекций, на которые можно воздействовать (и лечить) внутриклеточно, например, путем нацеливания бактерий или бактериофагов на желаемую область животного (клетка/ткань) путем введения обычными способами; и также может быть подходящим для применения *in vitro* и *ex vivo*. Используемые в настоящей заявке термины «терапевтический агент» и «активный агент» охватывают пептиды и нуклеиновые кислоты, которые кодируют полипептид по изобретению, а также векторы, бактериофаги, вирусы, бактерии и другие клетки, которые содержат пептиды и/или нуклеиновые кислоты, как описано в настоящей заявке. Терапевтические нуклеиновые кислоты по изобретению включают модифицированные/сконструированные бактериофаги, вирусы или бактериальные геномы.

Терапевтическое применение и применение терапевтических средств по изобретению включает любое заболевание, расстройство или другое медицинское

состояние, которое можно лечить путем экспрессии или доставки одноцепочечного димерного цитокина по изобретению субъекту, подлежащему лечению, с помощью любой методики доставки, применяемой в клиниках.

В соответствии с аспектами и воплощениями настоящего изобретения особенно предпочтительные заболевания включают рак и другие пролиферативные заболевания или расстройства, воспалительные заболевания или расстройства, вирусные, бактериальные и грибные инфекции и регенерацию тканей, раскрытые в других местах настоящего документа.

Один или более дополнительных фармацевтически приемлемых «носителей» (таких как разбавители, адъюванты, вспомогательные вещества или носители) могут быть объединены с терапевтическим агентом(ами) по настоящему изобретению в фармацевтической композиции. Подходящие фармацевтические носители описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. Фармацевтические составы и композиции по изобретению приготовлены в соответствии с нормативными стандартами и могут вводиться перорально, внутривенно, местно или другими стандартными путями. Используемый в настоящей заявке термин «носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибные агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, буферы, растворы-носители, суспензии, коллоиды и т.п. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. Кроме тех случаев, когда в терапевтических композициях предусматривается применение любых стандартных сред или агентов, несовместимых с активным ингредиентом. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композиции. Выражения «фармацевтически приемлемый» или «фармакологически приемлемый» относятся к молекулярным соединениям и композициям, которые не вызывают аллергической или подобной нежелательной реакции при введении человеку.

В соответствии с изобретением терапевтический агент(ы) может быть переработан в лекарственные средства или может быть включен в состав фармацевтических композиций. При введении субъекту терапевтический агент целесообразно вводить как компонент композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель. Молекулы, соединения и композиции по изобретению можно вводить любым удобным путем, например, внутрикожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, внутривенно, подкожно, интраназально, эпидурально, перорально, сублингвально, интраназально, интравагинально, чрескожно, ректально, путем ингаляции или местно на кожу. Введение

может быть системным или местным. Известные системы доставки также включают, например, инкапсуляцию в микрогели, липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, капсулы и т.д., и любая из них может быть использована в некоторых воплощениях для введения агентов по изобретению. Любые другие подходящие системы доставки, известные в данной области техники, также предусматриваются при использовании настоящего изобретения.

Приемлемые фармацевтические носители могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Фармацевтическими носителями могут быть физиологический раствор, аравийская камедь, желатин, крахмальная паста, тальк, кератин, коллоидный диоксид кремния, мочевины и т.п. Кроме того, могут использоваться вспомогательные, стабилизирующие, загущающие, смазывающие и красящие вещества. При введении субъекту фармацевтически приемлемые носители предпочтительно являются стерильными. Вода является подходящим носителем, особенно когда соединение по изобретению вводится внутривенно. В качестве жидких носителей также можно использовать солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина, особенно для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические носители включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду этанол и т.п. Настоящие композиции, если целесообразно, также могут содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или буферных агентов.

Лекарственные средства и фармацевтические композиции по изобретению могут иметь форму жидкостей, растворов, суспензий, лосьонов, гелей, таблеток, пилюль, пеллет, порошков, составов с модифицированным высвобождением (таких как замедленное или пролонгированное высвобождение), суппозиторий, эмульсий, аэрозолей, спреев, капсул (например, капсул, содержащих жидкости или порошки), липосом, микрочастиц или любых других подходящих составов, известных в данной области. Другие примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, Alfonso R. Gennaro ed., Mack Publishing Co. Easton, Pa., 19th ed., 1995, см, например, страницы 1447-1676.

В некоторых воплощениях терапевтические композиции или лекарственные средства по изобретению готовят в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для перорального введения (более

подходящего для человека). Композиции для пероральной доставки могут быть, например, в форме таблеток, пастилок, водных или масляных суспензий, гранул, порошков, эмульсий, капсул, сиропов или эликсиров. Таким образом, в различных воплощениях фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой капсулу, таблетку или пилюлю.

Композиции для перорального введения могут содержать один или более агентов, например, подсластителей, таких как фруктоза, аспартам или сахарин; ароматизаторов, таких как перечная мята, масло грушанки или вишни; красителей; и консервантов для получения фармацевтически привлекательного препарата. Когда композиция находится в форме таблетки или пилюли, композиции могут быть покрыты оболочкой для замедления распада и всасывания в желудочно-кишечном тракте, чтобы обеспечить замедленное высвобождение активного агента в течение длительного периода времени. Мембраны с избирательной проницаемостью, окружающие осмотически активное управляющее соединение, также подходят для перорально вводимых композиций. В этих лекарственных формах жидкость из среды, окружающей капсулу, впитывается движущим соединением, которое набухает, вытесняя агент или композицию агента через отверстие. Эти лекарственные формы могут обеспечить по существу профиль доставки с нулевым порядком в отличие от профилей с добавлением препаратов с немедленным высвобождением. Также можно использовать материал замедленного действия, такой как моностеарат глицерина или стеарат глицерина. Пероральные композиции могут включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т. д. Такие носители предпочтительно имеют фармацевтическую чистоту. Для пероральных составов местом высвобождения может быть желудок, тонкий кишечник (двенадцатиперстная кишка, тощая или подвздошная кишка) или толстый кишечник. Специалист в данной области может приготовить составы, которые не растворяются в желудке, но высвобождают материал в двенадцатиперстную кишку или в другой отдел кишечника. Соответственно, высвобождение позволит избежать вредного воздействия среды желудка либо за счет защиты пептида (или производного), либо за счет высвобождения пептида (или производного) за пределами среды желудка, например, в кишечнике. Для обеспечения полной устойчивости желудка необходимо покрытие, непроницаемое как минимум для pH 5,0. Примерами наиболее распространенных инертных ингредиентов, которые используются в качестве энтеросолюбильных покрытий, являются тримеллитат ацетата целлюлозы (САТ), фталат гидроксипропилметилцеллюлозы (НРМСР), НРМСР 50, НРМСР 55, поливинилацетатфталат (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ацетатфталат целлюлозы

(CAP), Eudragit L, Eudragit S и Shellac, которые можно использовать в качестве смешанных пленок.

Чтобы способствовать растворению терапевтического агента(ов) в водной среде, в качестве смачивающего агента можно добавить поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активные вещества могут включать анионные детергенты, такие как лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия. Можно использовать катионные детергенты, в том числе хлорид бензалкония или хлорид бензетомия. Потенциальные неионогенные детергенты, которые могут быть включены в состав в качестве поверхностно-активных веществ, включают: лауромакрогол 400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтилен гидрогенизированное касторовое масло 10, 50 и 60, моностеарат глицерина, полисорбат 20, 40, 60, 65 и 80, сложный эфир сахарозы и жирных кислот, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Эти поверхностно-активные вещества, если они используются, могут присутствовать в составе пептида или нуклеиновой кислоты или производного либо по отдельности, либо в виде смеси в различных соотношениях.

Обычно композиции для внутривенного введения содержат стерильный изотонический водный буфер. При необходимости композиции могут также включать солюбилизирующий агент.

Смеси полипептидов, полинуклеотидов, векторов, бактериофагов, бактерий и/или других клеток, как описано в настоящей заявке, можно приготовить в воде, подходящим образом смешанной с одним или более вспомогательными веществами, носителями или разбавителями. Также можно приготовить дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. В обычных условиях хранения и применения эти составы могут содержать консервант для предотвращения роста микроорганизмов. Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы и дисперсии и стерильные порошки для препаратов для немедленного приема стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий. Во всех случаях форма может быть стерильной и достаточно жидкой, чтобы обеспечить возможность инъекции соответствующим шприцем. Соответственно, композиция стабильна в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и/или растительные масла. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования

покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть осуществлено различными антибактериальными и фунгицидными агентами, например, парабенами, хлоробутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях, предпочтительно будет включать изотонические агенты, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированное поглощение инъеклируемых композиций может обусловлено применением в композициях агентов, замедляющих абсорбцию, например, моностеарат алюминия и желатин.

Для парентерального введения в водном растворе, например, раствор может содержать подходящий буфер, если необходимо, и жидкий разбавитель сначала становится изотоническим с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутриопухолевого и внутрибрюшинного введения. В этой связи специалистам в данной области известны стерильные водные среды, которые можно использовать.

Другим подходящим путем введения терапевтических композиций по изобретению является легочная или назальная доставка.

Для усиления поглощения клетками терапевтического агента по изобретению могут быть включены добавки, такие как жирные кислоты, олеиновая кислота, линолевая кислота и линоленовая кислота.

В некоторых воплощениях терапевтические агенты по изобретению также могут быть включены в составы для местного применения на коже субъекта.

В воплощениях изобретения терапевтические композиции могут включать только один терапевтический агент по изобретению; или может включать два или более, например, два взаимодополняющих терапевтических агента по изобретению. Например, ингибирование различных путей воспалительного ответа у целевого животного может быть достигнуто с помощью более чем одного одноцепочечного димерного цитокина по раскрытию или с помощью одноцепочечных димерных цитокинов, обладающих способностью нацеливания на два или более различных рецепторов. В частности, одноцепочечный димерный цитокин/фолдикин по изобретению может содержать мономер цитокина одного типа (например, IL-10), связанный с мономером цитокина другого типа (например, IL-22), так что каждый домен будет преимущественно нацеливаться на другой рецептор и потенциально разные воспалительные пути. Когда рассматриваются два (или более) терапевтических агента, разные пептиды или конструкции, кодирующие

нуклеиновые кислоты, такие как бактериофаг, вирус или бактерия, могут быть включены в одну и ту же фармацевтическую композицию или могут быть изготовлены отдельно. Если две (или более) фармацевтические композиции производятся для введения одному и тому же индивидууму, следует понимать, что композиции можно вводить одновременно, последовательно или раздельно, в соответствии с указаниями/необходимостью.

Способы доставки терапевтических агентов и композиций

Любой подходящий способ доставки для введения терапевтических агентов/терапевтических композиций по изобретению может быть использован в соответствии с раскрытием. Подходящий путь введения может быть определен квалифицированным практикующим врачом и может зависеть от одного или более факторов.

Доставка терапевтических агентов или композиций по изобретению может быть системной или местной. Например, путь введения может определяться местом и/или характером заболевания, например, раком или воспалительным состоянием, подлежащим лечению, и может включать: внутрикожное, чрескожное, парентеральное, внутривенное, внутримышечное, интраназальное, подкожное, региональное (например, вблизи опухоли/ткани-мишени), чрескожное, внутритрахеальное, внутрибрюшинное, внутриартериальное, внутрипузырное, внутриопухолевое, ингаляционное, перфузионное, лаваж и пероральное введение, например, как описано в патенте США No № 5543158; в патенте США No № 5641515 и в патенте США No № 5399363. Обычно удобные формы системного введения могут включать пероральное введение, парентеральное введение, интраназальное введение, сублингвальное введение, ректальное введение, чрескожное введение или любые их комбинации.

В различных воплощениях терапевтические агенты/композиции можно вводить непосредственно в целевую ткань, орган или опухоль. В некоторых особенно полезных воплощениях терапевтические композиции по настоящему изобретению могут быть доставлены путем инъекции в сосудистую сеть субъекта.

В некоторых воплощениях (непрерывное) введение/введение в течение длительного периода времени может быть предпочтительным и может быть достигнуто любым подходящим механизмом, например, путем имплантации катетера в опухоль, сосудистую систему или ткань. Соответственно, доза терапевтической композиции при непрерывной перфузии может быть эквивалентна дозе, вводимой при однократной или многократной инъекции, скорректированной в течение периода времени, в течение которого происходит перфузия.

Инъекцию конструкций нуклеиновой кислоты, векторов и/или клеток можно

осуществлять с помощью шприца или любого другого метода, используемого для инъекции раствора, при условии, что экспрессирующая конструкция (например, бактерия) может проходить через иглу определенного размера, необходимую для инъекции. В некоторых воплощениях можно использовать безыгольную инъекционную систему, известную специалисту, например как описано в патенте США No № 5846233.

Схемы и дозы терапевтического лечения

Схемы лечения могут различаться и часто зависят от типа и/или локализации заболевания, например опухоли, стадии/прогрессирования заболевания и/или состояния здоровья и возраста пациента. Например, некоторые опухоли могут лучше реагировать на лечение локализованными и/или высококонцентрированными дозами терапевтической композиции по настоящему изобретению, тогда как другие заболевания (и индивидуумы) могут получить пользу от более диффузного и/или низкодозового и/или длительного введения терапевтического агента. Квалифицированный врач сможет определить подходящий режим терапевтического лечения в каждом случае.

В различных аспектах и воплощениях изобретение обеспечивает терапевтическое применение и способы лечения субъекта путем введения одного или более терапевтических агентов, как раскрыто в настоящей заявке. Соответственно, изобретение обеспечивает применение и способы уменьшения размера и/или роста опухоли путем стимулирования гибели опухолевых клеток-мишеней. Применение и способы включают введение индивидууму или в опухолевую клетку или в первичную популяцию клеток-мишеней индивидуума терапевтически эффективного количества терапевтической композиции или агента по настоящему раскрытию, такого как одноцепочечный цитокин по настоящему изобретению, или агент, который вызывает экспрессию одноцепочечного цитокина. Таким образом, выгодно, что при использовании вектора или агента доставки (например, бактерии, вируса, клетки или бактериофага), который может реплицироваться и вызывать экспрессию и/или высвобождение нескольких копий одноцепочечного цитокина в сайте-мишени, нет необходимости непосредственно вводить терапевтический агент в каждую клетку-мишень или область (например, в опухоли) субъекта начальную дозу терапевтического агента или носителя. Скорее, позволяя терапевтическому агенту пролиферировать или продуцировать множество копий одноцепочечного цитокина по настоящему изобретению, может быть достигнут усиленный терапевтический эффект.

Эффективное количество одноцепочечного цитокина или другого терапевтического агента по настоящему изобретению или его фармацевтической композиции может включать количество, достаточное для индукции онколизиса/уничтожения опухолевой клетки-мишени и/или нарушения лизиса или пролиферации опухолевой клетки-мишени,

или ингибирование или уменьшение роста или размера опухолевой клетки-мишени или опухоли. Снижение роста опухоли или опухолевой клетки-мишени может проявляться, например, посредством гибели клеток или более медленной скорости репликации или снижения скорости роста опухоли, содержащей клетку, или длительного выживания субъекта, содержащего опухолевую клетку. В альтернативных аспектах и воплощениях эффективное количество одноцепочечного цитокина или другого терапевтического агента по настоящему изобретению или его фармацевтической композиции может включать количество, достаточное для снижения воспалительной реакции у целевого индивидуума, ткани или органа, как например, в легких.

Соответственно, в некоторых воплощениях предложено терапевтическое применение и способы лечения субъекта, имеющего рак или опухоль, или воспалительным заболеванием или расстройством (таким как заболевание легких, например, астма), включающие введение субъекту эффективного количества терапевтического агента по раскрытию. В некоторых воплощениях опухоль может быть полностью или практически уничтожена. В некоторых воплощениях воспалительная реакция может быть полностью или существенно устранена.

Применение и способы по раскрытию могут включать введение субъекту или индивидууму терапевтического агента. Введение может осуществляться любым подходящим способом, например, путем инъекции или приема внутрь. Введение может быть системным или местным, например, непосредственно в место опухоли. В одном воплощении предпочтительна системная доставка.

Терапевтические композиции и/или методы лечения могут включать различные «единичные дозы», где единичная доза может быть определена как содержащая заранее определенное количество терапевтического агента или композиции. Определение подходящего количества для введения, а также конкретного пути введения и состава находится в компетенции специалистов в области клинической практики. Стандартную дозу можно вводить, например, в виде однократной инъекции или таблетки; но его также можно вводить в течение длительного периода времени, например, посредством непрерывной инфузии в течение установленного периода времени.

В некоторых воплощениях терапевтический агент можно вводить в одной или более дозах в течение установленного периода времени (например, в течение 12 или 24 часов), которые вместе составляют «разовую дозу». В других воплощениях каждое индивидуальное введение можно рассматривать как «разовую дозу».

Терапевтические композиции и/или агенты по настоящему изобретению можно вводить в нескольких дозах (например, 2, 3, 4, 5, 6 или более доз), если это считается

целесообразным, в течение подходящего периода лечения – например, в течение периода около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней, недель, месяцев или лет, в зависимости от необходимости. Частота введения терапевтического агента и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке, может определяться практикующим врачом, но может составлять, например, один раз в день, два раза в день, один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в месяц, раз в 2 месяца, раз в 3 месяца, раз в 6 месяцев и так далее.

Кроме того, в соответствии со схемами терапевтического лечения, которые могут быть разработаны, разовая доза может варьироваться в зависимости от стадии или типа лечения, а также с учетом размера и/или возраста субъекта или типа заболевания, которое предназначено для лечения. Например, в некоторых воплощениях первая доза терапевтического агента или фармацевтической композиции по настоящему раскрытию, вводимая субъекту, может быть меньше или выше, чем любая вторая, третья или последующая доза, которая может быть введена. В других воплощениях в течение первого периода введения доза может быть ниже или выше, чем доза, вводимая во время второго, третьего или последующего периода введения. Квалифицированный практикующий врач может определить продолжительность любого такого периода введения, например, около 1 дня, около 1 недели или около 1 месяца, или в течение любого промежуточного или более длительного периода времени.

В некоторых примерах субъекту, подлежащему лечению, может быть введен один или более дополнительных терапевтических агентов или он может получить одну или более дополнительных традиционных (таких как лучевая терапия или химиотерапия) или дополнительных методов лечения.

Комбинированные Терапии

В различных воплощениях применения и способы по настоящему раскрытию включают введение терапевтического агента по настоящему раскрытию (например, полипептида, полинуклеотида, вектора или клетки (например, рекомбинантной бактериальной клетки, как раскрыто в настоящей заявке) или фармацевтической композиции, содержащей терапевтический агент по настоящему раскрытию, в комбинации с одной или более дополнительной терапией или терапевтическим агентом. Одну или более дополнительных терапий или терапевтических агентов можно вводить одновременно, последовательно или отдельно (до или после) терапевтического агента согласно настоящему раскрытию.

Дополнительный терапевтический агент может представлять собой другой терапевтический агент согласно настоящему раскрытию, так что два терапевтических агента по изобретению вводят в комбинации. Другие примеры дополнительной терапии

или терапевтического агента могут включать, без ограничения указанным, химиотерапию, лучевую терапию, онколитическую вирусную терапию с использованием дополнительного вируса, лечение иммуномодулирующими белками, противораковые агенты, противовоспалительными средствами или любую их комбинацию.

В конкретных воплощениях дополнительный терапевтический агент представляет собой противораковый агент или противораковую терапию. Противораковые агенты могут включать, без ограничения указанным, химиотерапевтические агенты, радиотерапевтические агенты, цитокины, ингибиторы иммунных контрольных точек, антиангиогенные агенты, агенты, индуцирующие апоптоз, противораковые антитела и/или антициклин-зависимые киназные агенты. Противораковая терапия может включать химиотерапию, биологическую терапию, лучевую терапию, иммунотерапию, гормональную терапию, противососудистую терапию, криотерапию, токсинотерапию и/или хирургическое вмешательство или их комбинации.

В различных воплощениях лечение рака может включать хирургическую процедуру. Такая хирургическая операция может включать резекцию, при которой вся или часть опухолевой ткани физически удаляется у субъекта (например, путем иссечения) и/или уничтожается иным образом. Резекция опухоли означает физическое удаление, по меньшей мере, части опухоли. Помимо резекции опухоли, хирургическое лечение включает лазерную хирургию, криохиргию, электрохиргию и хирургию под микроскопом (операцию Мооса). В некоторых воплощениях может быть установлено, что опухоль (или ее часть) следует удалить путем резекции или, альтернативно, что опухоль не пригодна для резекции. В таких обстоятельствах воплощения изобретения могут включать лечение субъекта терапевтическими агентами или композициями по настоящему раскрытию с целью улучшения результата резекции или обеспечения возможности удаления опухоли или ее части. Таким образом, терапевтические методы лечения по настоящему раскрытию могут повысить резектабельность опухоли, например, благодаря сокращению краев опухоли или устранению инвазивных частей. Дополнительные методы лечения после резекции будут способствовать устранению микроскопического остаточного заболевания в месте опухоли.

Наборы

В воплощениях настоящего раскрытия предлагается набор для введения одноцепочечного димерного цитокина, кодирующего полинуклеотида, вектора, клетки или другого агента (такого как бактерия или бактериофаг), как описано в настоящей заявке. В некоторых воплощениях набор по настоящему изобретению может включать «терапевтический агент», такой как одноцепочечный димерный цитокин, кодирующий

полинуклеотид, вектор, клетку (например, бактерию) или бактериофаг, или (фармацевтическую) композицию, содержащую такой терапевтический агент, как описано выше. В некоторых воплощениях набор по настоящему раскрытию может дополнительно включать один или более компонентов, таких как инструкции по применению, устройства и дополнительные реагенты, а также компоненты, такие как пробирки, контейнеры и шприцы для выполнения способов и методов лечения, раскрытых в настоящей заявке. В различных воплощениях набор по настоящему раскрытию может дополнительно включать один или более активных агентов, например, по меньшей мере, один, выбранный из группы, состоящей из противоракового агента, иммуномодулирующего агента, противовоспалительного агента или любых их комбинаций, который можно вводить в комбинации (отдельно, последовательно или одновременно) с терапевтическим агентом по настоящему раскрытию.

В некоторых воплощениях набор согласно раскрытию может содержать один или более контейнеров, содержащих терапевтический агент, один или более дополнительных активных агентов и/или любые реагенты, как описано в настоящей заявке.

В некоторых воплощениях набор может дополнительно включать аппарат или устройство для введения терапевтического агента (такого как рекомбинантные бактерии) по раскрытию и/или любого дополнительного активного агента субъекту. Подходящий аппарат или устройство может включать одну или более игл для подкожных инъекций, внутривенную иглу, катетер, безыгольное инъекционное устройство, ингалятор и/или дозатор жидкости.

Инструкции по использованию набора могут включать описание того, что должен включать в себя набор и как его следует правильно использовать; например, как различные компоненты набора следует вводить индивидууму, включая время, концентрации и количества; надлежащие методы введения и то, как/нужно ли наблюдать за индивидуумом во время применения/лечения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение вариантов PL-10 и одноцепочечного димерного PL-10

Если не указано иное, использовали коммерчески доступные реагенты и стандартные методы молекулярной биологии и биохимии.

Материалы и методы

Следующие процедуры, использованные заявителем, описаны в Sambrook, J. et al., 1989, см. выше: анализ продуктов расщепления ферментами рестрикции на агарозных гелях и приготовление фосфатно-солевого буферного раствора. Реагенты общего назначения, олигонуклеотиды, антитела, химикаты и растворители были приобретены у

компании Merck. Ферменты и полимеразы были получены от New England Biolabs (NEB), если не указано иное.

Методы

Штаммы бактерий и условия их культивирования

Использованные штамм WT *Mycoplasma pneumoniae* M129-B7 (ATTC 29342) и все штаммы *M. pneumoniae*, созданные в этой работе, описаны в Таблице 1. Штаммы микоплазмы выращивали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в культуральных матрасах (Corning) с жидкой средой Хейфлика. Среду Хейфлика готовили путем смешивания 800 мл неполной среды А (20 г бульона PPLO [Difco, #255420], 30 г HEPES [конечная 100 мМ], 25 мл 0,5% раствора фенолового красного [Sigma, #P3532]), 200 мл инактивированной нагреванием лошадиной сыворотки (Life Technologies, #26050088), 20 мл стерильно отфильтрованной 50% глюкозы и 1 мл исходного раствора ампициллина 100 мг/мл (конечная концентрация 100 мкг/мл, натриевая соль ампициллина [Sigma, #A9518]). Если требовался рост на чашке, в бульон Хейфлика добавляли 0,8% бактоагар (Difco). При необходимости в бульон Хейфлика добавляли тетрациклин или хлорамфеникол (Тс; 20 мкг мл⁻¹ Ст; 20 мкг мл⁻¹) для отбора клеток. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 выращивали на чашках с агаром триптиказо-соевого бульона (TSB, T8907) при 37°C. Для клонирования использовали штамм *E. coli* NEB® 5-alpha High-Efficiency (New England Biolabs); его выращивали при 37°C в бульоне LB или на чашках с агаром LB с добавлением ампициллина (100 мкг мл⁻¹).

Клеточные линии

Клетки HAFTL представляют собой клеточную линию пре-B-клеток мыши, полученную из фетальной печени и трансформированную Na-ras-онкогеном (47). VLaER1 представляют собой клеточную линию лейкоза B-клеток-предшественников человека (48); обе клеточные линии были любезно предоставлены профессором Томасом Графом (Thomas Graf). Клеточная линия ТНР-1 представляет собой клеточную линию моноцитов, полученную из периферической крови, приобретенную у АТСС. Клетки выращивали в среде RPMI (12633012, GIBCO), с добавлением 2 мМ L-глутамин (25030081, GIBCO), 100 ед/мл пенициллина + 100 нг/мл стрептомицина (15140122, GIBCO) и 20% FBS (10270-106, GIBCO).

Создание плазмид

Все плазмиды, полученные в этой работе, были собраны по методу Гибсона⁴⁷. При необходимости корпорация Integrated DNA Technologies (IDT) проводила синтез генов (двухцепочечные фрагменты gBlock) и синтез олигонуклеотидов. Амплификацию гена проводили с помощью ДНК-полимеразы Phusion (Thermo Fisher Scientific). В некоторых

примерах последовательность промотора для вариантов IL-10 и фолдикина_10 представляла собой синтетический промотор P3⁴⁸ и использовали сигнал секреции, названный S142 (US 15/553552, Garrido et al., 2021). Для вариантов IL-22 и IFN-лямбда использовали промотор pSynL (GTТААСGATТАAGATСААААAGTGCCTGGTATCGТАААТААТАТТGTАТААТТАААААААГААТ; SEQ ID NO: 339). Подробный перечень плазмид, штаммов и их генетических частей также приведен в Таблице 1. Все плазмиды проверяли с помощью ПЦР и секвенирования по Сэнгеру (GATC biotech).

Создание штамма *M. pneumoniae* CV8

CV8 является производным штаммом аттенуированного штамма CV2 (Δ mpn133, Δ mpn372)⁵⁸, в котором mpn051 заменен геном gpsA из *Mycoplasma penetrans*. Ферменты, кодируемые этими двумя генами, участвуют в окислении глицерин-3-фосфата и генерируют побочные продукты метаболизма NADH в случае фермента GpsA или H₂O₂ в случае фермента GlpD, кодируемого mpn051; это продукция H₂O₂ имеет решающее значение для цитотоксического действия *M. pneumoniae*. Штамм CV8 также несет в себе вторую делецию гена, при которой ген устойчивости к пурамицину (введенный для отбора вставки гена, кодирующего GP35) был удален из его местоположения в геноме (mpn560). Мутанты создавали с использованием инструментов редактирования генома, адаптированных к микоплазме, на основе рекомбиназы оцДНК GP35⁴⁹. В качестве субстрата для рекомбинации использовались длинные участки оцДНК, полученные, как описано ранее⁵⁰.

Последовательности праймеров и плазмид, использованных для создания длинных участков оцДНК, показаны в Таблице 4.

Штаммы

Для экспрессии и секреции различных версий человеческих цитокинов, таких как IL-10 (hIL-10), и различных конструкций фолдикинов в бактериях, таких как *M. pneumoniae*, транспозонные векторы были созданы путем объединения соответствующей последовательности промотора с конструкциями цитокинов и фолдикинов, содержащими соответствующий сигнальный пептид. Для экспрессии и секреции вариантов IL-10 и фолдикинов, имеющих N-концевые последовательности IL-10, использовали синтетический промотор P3 вместе с сигнальным пептидом 142 (s142) на N-конце для секреции (генетическую информацию каждой конструкции см. в Таблице 1). Для экспрессии и секреции вариантов IL-22 и IFN-Lambda и соответствующих фолдикиновых конструкций использовали синтетический промотор pSynL, объединенный с сигнальным пептидом (s142). Также использовали маркер устойчивости к тетрациклину (см.

«Методы»).

Для создания клеток *M. pneumoniae* различные плазмиды трансформировали либо в *M. pneumoniae* WT, либо в *M. pneumoniae* CV8. Клетки выращивали в культуральном матрасе площадью 75 см² (Corning), содержащем 20 мл свежей среды Хейфлика, и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ до поздней экспоненциальной фазы. Клетки дважды промывали предварительно охлажденным буфером для электропорации (272 мМ сахарозы, 8 мМ HEPES, pH 7,4), ресуспендировали, соскребали и пропускали 10 раз через иглу шприца 25 калибра (G25). Аликвоты клеток по 50 мкл в кюветках диаметром 0,1 см с 2 мкг нужной плазмиды выдерживали на льду в течение 20 мин. Настройки электропорации были установлены на 1250 В/25 мкФ/100 Ом в аппарате BIO-RAD Gene Pulser Xcell. После импульса к клеткам добавляли 420 мкл свежей среды Хейфлика. Из этой культуры 80 мкл инокулировали в культуральный матрас площадью 25 см² (Corning) 5 мл свежей среды Хейфлика с селективным антибиотиком (т.е. 20 мкг/мл хлорамфеникола или тетрациклина). Из различных экспрессирующих клеток *M. pneumoniae* 50 мкл исходного инокулята добавляли в культуральный матрас площадью 25 см² (Corning), содержащий 5 мл свежей среды Хейфлика, и выращивали в течение 48 часов. Затем культуральную среду собирали и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин, а надосадочные жидкости хранили при -80°C в аликвотах по 1 мл.

Идентификация дисульфидов методом масс-спектрометрии

Из аликвот, исходно приготовленных и хранившихся при -80°C, исходный инокулят в количестве 25 мкл hIL-10, MutSC1 или MutSC2 инокулировали в матрас T25 см² с 5 мл среды Хейфлика, дополненной Cm в двух экземплярах. Через 24 часа среду удаляли из одного из дубликатов и заменяли версией 13 определенной среды (см., например, EP20382261). Через 36 часов надосадочную жидкость обоих дубликатов собирали и обрабатывали для протеомного анализа. Никаких различий в содержании белка не наблюдали ни в одном наборе условий. Для дальнейшей характеристики образцы выращивали в версии 13 определенной среды.

Надосадочные жидкости собирали, концентрировали с помощью MWCO 3K и центрифугировали в течение 15 минут при 12000 об/мин с 700 мкл надосадочной жидкости. Затем в ту же колонку MWCO добавляли 200 мкл надосадочной жидкости и смесь центрифугировали в течение 60 мин при 4°C и 12000 об/мин. Конечный концентрированный объем около 100 мкл разделяли на две части: одну для количественного определения BCA, а другую для MS-анализа. Каждую из свежесконцентрированных аликвот ресуспендировали в 100 мкл 4% SDS, 0,1 М HEPES. Лизаты надосадочных жидкостей определяли количественно с помощью BCA с

использованием набора для анализа белка Pierce™ BCA (Thermo Fisher Scientific, 23225) и отправляли в центр UPF MS для анализа. Для подготовки проб цистеины метили путем алкилирования N-этилмалеимидом (30 нмоль, 37°C, 60 мин), а затем образцы осаждали 6 объемами холодного ацетона. Осадки растворяли в 6 М мочеvine/200 мМ бикарбоната аммония, образцы восстанавливали дитиотреитолом (30 нмоль, 37°C, 60 мин) и алкилировали в темноте йодацетамидом (60 нмоль, 25°C, 30 мин).

Затем образцы гидролизовали следующим образом, используя 200 мМ бикарбоната аммония для всех разведений. Для hIL-10 и MutSC2 полученный белковый экстракт сначала разводили до 2 М мочеvine, а затем инкубировали с эндопротеиназой Lys-C (эндо-LysC) (1:100 по массе, 37°C, 6 ч, Wako, кат. № 129-02541); затем образцы разбавляли в 2 раза (1:100 по массе) и гидролизовали i) трипсином (37°C, в течение ночи; Promega кат. № V5113); ii) химотрипсином (25°C, ночь; Roche Diagnostics кат. № 11418467001); или iii) GluC (25°C, ночь; Sigma Aldrich, кат. № P6181). Образцы сначала разбавляли до 6 М мочеvine для гидролиза трипсином (1:100 по массе, 37°C, в течение ночи, Promega, кат. № V5113), а затем расщепляли GluC (1:100 по массе, 25°C, o/n, Sigma Aldrich кат. № P6181). Для MutSC1 смесь для комбинаторного гидролиза была следующей: i) эндо-LysC плюс трипсин: разбавляли до 2 М мочеvine для эндо-LysC (1:100 по массе, 37°C, 6 часов, Wako, кат. № 129-02541) и затем разбавляли в 2 раза для трипсина (1:100 по массе, 37°C, ночь, Promega, кат. № V5113); ii) эндо-LysC плюс химотрипсин: разбавляли до 2 М мочеvine для эндо-LysC (1:100 по массе, 37°C, 6 ч, Wako, кат. № 129-02541), а затем разбавляли в 2 раза для гидролиза трипсином (1:100 по массе, 25°C, в течение ночи, Roche Diagnostics, кат. № 11418467001); iii) LysC плюс GluC: разбавляли до 2 М мочеvine для эндо-LysC (1:100 по массе, 37°C, 6 ч, Wako, кат. № 129-02541), а затем разбавляли в 2 раза для GluC (1:100 по массе), 25°C, ночь, Sigma Aldrich, кат. № P6181); и iv) трипсин плюс GluC: разбавляли до 6 М мочеvine для гидролиза трипсином (1:100 по массе, 37°C, ночь, Promega, кат. № V5113), а затем гидролизовали GluC (1:100 по массе, 25°C, ночь, Sigma Aldrich кат. № P6181). Во всех случаях образцы пептидов после гидролиза подкисляли муравьиной кислотой и обессоливали на колонке MicroSpin C18 (The Nest Group, Inc) перед анализом ЖХ-МС/МС.

Для хроматографического и МС-анализа использовали следующий протокол. Образцы анализировали с использованием масс-спектрометра LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, Сан-Хосе, Калифорния, США), соединенного с EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific (Proxeon), Оденсе, Дания). Пептиды загружали в колонку Nano Trap 2 см с внутренним диаметром 100 мкм, набитую частицами C18 размером 5 мкм (Thermo Fisher Scientific), и разделяли обращенно-фазовой хроматографией с

использованием колонки 25 см с внутренним диаметром 75 мкм, набитой частицами C18 размером 1,9 мкм (Nikkyo Technos Co., Ltd. Япония). Хроматографические градиенты начинались с 93% буфера А и 7% буфера В со скоростью потока 250 нл мин⁻¹ в течение 5 минут и постепенно увеличивались до 65% буфера А и 35% буфера В через 120 минут. После каждого анализа колонку промывали в течение 15 мин 10%-ным буфером А и 90%-ным буфером В. Буфер А – 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в воде; буфер В, 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле. Масс-спектрометр работал в режиме положительной ионизации с напряжением нанораспыления, установленным на уровне 2,1 кВ, и температурой источника 300°C. Ultramark 1621 использовали для внешней калибровки FT mass-анализатора перед анализом, а внутреннюю калибровку проводили с использованием фонового сигнала иона полисилоксана при m/z 445,1200. Измерения проводили в режиме сбора данных (DDA), а полное MS-сканирование с 1 микросканированием с разрешением 60000 использовалось в диапазоне масс m/z 350–2000 с обнаружением в Orbitrap. Автоматическая регулировка усиления (AGC) была установлена на 1Е6, было активировано динамическое исключение (60 секунд) и фильтрация состояния заряда, дисквалифицирующая однозарядные пептиды. В каждом цикле анализа DDA и после каждого обзорного сканирования для фрагментации отбирали двадцать наиболее интенсивных ионов с несколькими заряженными ионами, превышающими пороговое количество ионов 5000. Спектры фрагментированных ионов были получены посредством диссоциации, индуцированной столкновениями (CID) при нормированной энергии столкновения 35%, и были получены в масс-анализаторе с ионной ловушкой. AGC устанавливали на 1Е4, использовали окно изоляции 2,0 m/z , время активации 10 мс и максимальное время ввода пробы 100 мс. Все данные были получены с помощью программного обеспечения Xcalibur v2.2. Гидролизированный бычий сывороточный альбумин (New England Biolabs кат. № P8108S) анализировали между каждым образцом, чтобы избежать переноса образца и гарантировать стабильность прибора; QCloud (53) использовали для контроля продольных характеристик прибора в ходе проекта.

Данные анализировали с использованием пакета программного обеспечения Proteome Discoverer (v2.0, Thermo Fisher Scientific) и поисковой системы Mascot (v2.6, Matrix Science (54)). Поиск данных проводили по *M. pneumoniae* (87071 запись), а также hIL-10, MutSC1, MutSC2, и списку распространенных примесей (55) и по всем соответствующим ложным записям. Для идентификации пептида для уровня MS1 использовали допуск по массе ионов-предшественников 7 м.д., в качестве фермента расщепления был выбран трипсин и допускалось до трех пропущенных расщеплений. Допуск по массе фрагментных ионов был установлен равным 0,5 Да для спектров MS2. В

качестве переменных модификаций использовали окисление метионина, ацетилирование N-концевого белка, карбамидометилирование цистеинов и N-этилмалеимида. Частота ложноположительных результатов (FDR) при идентификации пептидов была установлена на максимум 5%. Данные количественного определения пептидов были получены из узла «Детектор площади ионов-предшественников» из Proteome Discoverer (v2.0) с использованием допуска по массе 2 м.д. для пептида, экстрагируемого ионным током (ХИС). Полученные значения использовали для расчета трех верхних областей белка с уникальным пептидом для разгруппированного белка.

Для MutSC1 проводили PRM (мониторинг параллельных реакций)-хроматографию и MS-анализ. Чтобы подтвердить, что первый цистеин карбамидометилирован, образец гидролизовали эндо-LysC с трипсином и анализировали с использованием Orbitrap Eclipse (Thermo Fisher Scientific) в сочетании с системой EASY-nanoLC 1200 UPLC (Thermo Fisher Scientific) с использованием метода PRM. Пептиды загружали непосредственно в аналитическую колонку и разделяли обращенно-фазовой хроматографией с использованием колонки 50 см с внутренним диаметром 75 мкм, заполненной частицами 2 мкм C18 (Thermo Scientific, Сан-Хосе, Калифорния, США).

Хроматографические градиенты начинались с 95% буфера А и 5% буфера В со скоростью потока 300 нл/мин в течение 5 минут и постепенно увеличивались до 25% буфера В и 75% А в течение 79 минут, а затем до 40% буфера В и 60% буфера А около 11 мин. После каждого анализа колонку промывали в течение 10 мин 10% буфером А (0,1% муравьиной кислоты в воде) и 90% буфером В (0,1% муравьиной кислоты в 80% ацетонитриле).

Масс-спектрометр работал в режиме положительной ионизации с наноисточником EASY-Spray при напряжении 2,4 кВ и температуре источника 305°C. Полное MS-сканирование с 1 микросканированием с разрешением 30000 использовалось в диапазоне масс m/z 350-1400 с детектированием в масс-анализаторе Orbitrap. Для сбора данных использовали метод PRM с окном квадрупольной изоляции, установленным на 1,4 m/z , и MSMS-сканированием в диапазоне масс m/z 300–2000 с обнаружением в Orbitrap с разрешением 60000. Фрагментацию МСМС выполняли с использованием HCD при 30 NCE, автоматическую регулировку усиления (AGC) была установлена на 1×10^5 , а максимальное время ввода 502 мс. Массы пептидов (m/z) определяли в списке масс и они показаны в Таблице S2. Для анализа данных PRM использовали программное обеспечение Skyline-Daily (4) (v21.1.9.353) для создания библиотек, которые наблюдали как результаты поиска MaxQuant (1.6.10) и прогнозировали с помощью Prosit (5), и для извлечения фрагментов каждого пептида.

Количественная оценка экспрессии интерлейкина в бактериальных штаммах

Для проверки экспрессионной способности каждого из мутантных кандидатов клетки собирали в 1 мл свежей среды Хейфлика (например, клетки выращивали прикрепленными к матрасу, среду аспирировали и добавляли 1 мл свежей среды). Клетки помещали точками по 10 мкл в чашки с твердой средой Хейфлика и выращивали в течение десяти дней при 37°C, 5% CO₂. Колониеобразующие единицы (КОЕ) подсчитывали в различных диапазонах разведений: от неразведенных до разведенных 1×10^{-8} . Для каждого анализируемого состояния концентрацию различных экспрессируемых вариантов IL-10 определяли количественно с помощью ELISA.

Для количественного определения IL-10 проводили ELISA для IL-10 человека (ELISA MAX Deluxe Set Human IL-10) (Biolegend; #430604) в соответствии с инструкциями производителя. Надосадочные жидкости разбавляли в 100000 раз, чтобы этот анализ вошел в диапазон обнаружения. В качестве положительного контроля для каждого анализа коммерческий рекомбинантный IL-10 (#200-10, Peprotech) (hIL-10r) или рекомбинантный IL-22 (#200-22, Peprotech) восстанавливали в PBS в концентрации 10 мкг/мл и хранили при -80°C в аликвотах по 20 мкл. Кривую коммерческого IL-10, используемую для определения концентрации мутантов, аппроксимировали к полиномиальному уравнению 2 степени. Ту же самую процедуру использовали для количественного определения IL-22 с помощью ELISA (ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-22, 434504, BioLegend) или набора ELISA для интерферона лямбда ((LEGEND MAX™ Human IL-29 (IFN-λ1), Biolegend). Химеры SCIL10IL22 молекул фолдикина-22 (описанные ниже) определяли количественно с использованием набора ELISA для IL-22.

Выделение моноцитов крови

Образцы крови четырех здоровых доноров были предоставлены Banc de Sang i Teixits (Барселона, Испания) в соответствии с соглашением № 160002, одобренным Министерством науки и технологий Испании. Перед сбором образцов от доноров было получено письменное информированное согласие.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PMBC) выделяли из лейкоцитной пленки с помощью пробирок Leucoser® в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 10 мл образцов крови разбавляли в соотношении 1:5 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), разливали в пробирки Leucoser® и центрифугировали в течение 15 минут при 800 g при комнатной температуре. PMBC собирали с помощью пипетки Пастера, промывали 2 раза PBS и, наконец, ресуспендировали в 3 мл PBS. Моноциты выделяли с помощью магнитной метки CD14⁺ и дифференцировали в макрофаги, как описано ранее⁵⁴. Вкратце, клетки очищали с использованием CD14-

положительных колонок для селекции микрогранул и MACS-разделения (Miltenyi Biotec) в соответствии с инструкциями производителя.

Для дифференциации макрофагов, происходящих из моноцитов, моноциты прикрепляли к покровным стеклам (VWR International) в 6-луночных планшетах (Thermo Scientific) из расчета $1,5 \times 10^6$ клеток на лунку в течение 1 часа при 37°C в теплой среде RPMI 1640 (GIBCO). Затем в среду добавляли конечную концентрацию 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Sigma-Aldrich) и человеческого рекомбинантного макрофаг-колониестимулирующего фактора (M-CSF, Peprotech) в концентрации 20 нг мл^{-1} . Клеткам давали возможность дифференцироваться в течение 6–8 дней.

Культура клеток HEK-blue™

Клеточные линии HEK-blue™ IL-10, IL-22, IFN-Lambda, несущие репортерную конструкцию SEAP, были приобретены у InvivoGen (InvivoGen, Сан-Диего, Калифорния, США). Клетки выращивали в среде DMEM (Lonza, BE12-604F) с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамина. В клетки HEK-IL-10 добавляли 100 мкг/мл нормоцина и селективные антибиотики. В клетки HEK-blue IL-22 и HEK-blue-IFN-Lambda добавляли бластицидин, пурамицин, зеоцин™. Клетки пассировали при достижении 70% конfluenceности, следуя рекомендациям производителя.

Тестирование активности сконструированных кандидатов в клетках HEK-blue™

После количественного определения надосадочной жидкости с помощью ELISA (см. «Методы») аликвоты различных супернатантов по 200 мкл хранили при -80°C . Используя свежую среду Хейфлика для разведения образцов, для каждого мутантного кандидата готовили различные «аликвоты-кандидаты» по 500 мкл следующих концентраций (30, 15, 7,5, 3,75, 1,88, 0,94, 0,47 и $0,23 \text{ нг мл}^{-1}$), а также для рекомбинантного белка. Необходимый объем надосадочной жидкости определяли количественным ELISA, и объем соответствующим образом корректировали с помощью свежей среды Хейфлика для достижения указанной выше концентрации в добавке объемом 20 мкл.

Параллельно готовили суспензию клеток HEK-blue™ IL-10, IL-22 или IFN-Lambda в количестве 280000 клеток/мл в предварительно нагретой DMEM с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамина (без антибиотиков). После этого по 180 мкл на лунку высевали в 96-луночный планшет (Nunc Microwell, ThermoFisher Scientific, #167008). Из этого количества добавляли по 20 мкл каждой «аликвоты-кандидата» или рекомбинантного белка в фиксированной концентрации, приготовленного в среде Хейфлика, и клетки выдерживали в течение 24 часов при 37°C и 5% CO_2 (индуцированные HEK-клетки).

Через 24 часа 180 мкл раствора QUANTI-Blue (среда для обнаружения щелочной фосфатазы, #perqbs, InvivoGen) смешивали с 20 мкл индуцированных НЕК-клеток в новом 96-луночном планшете. Затем клетки инкубировали 60 минут при 37°C и измеряли поглощение (630 нм) на спектрофотометре Tecan i-control, 2.0.10.0.

Генерация одноцепочечных (SC) молекул с использованием программного обеспечения ModelX.

Предложенные варианты SC-IL10 были созданы путем перестройки рентгеновской димерной структуры IL-10 (PDB: 1y6k, 2ilk). Новые возможности подключения были продуманно разработаны с помощью набора инструментов ModelX. Использовалась команда ModelX Bridging (режим Cross-Linking); он соединяет пару остатков, выбранных в качестве якорей, со всеми геометрически совместимыми фрагментами из специально созданной библиотеки белковых фрагментов (PerXDB_5k). Команда Bridging позволяет пользователю выбирать пептиды различной длины; На выходе получается совокупность соединенных моделей, в котором линкеры/соединения с запрещенными фи- и пси-диэдрами на графике Рамачандрана отброшены.

Когда пептиды длиннее пронумерованных положений между якорями, Bridging перенумеровывает избыточные остатки с помощью res-кодов, которые не распознаются FoldX на дальнейших стадиях моделирования. По этой причине конструкция SC-IL10 потребовала количественной перестановки мономерных белковых остатков в димере, что позволило создать пронумерованные промежутки длиной в 18 аминокислот между соединяемыми областями. Это очень важно для экстремального случая, когда якорные остатки фланкируют числовой пробел. Чтобы охватить эту ситуацию, была произведена перенумерация, чтобы создать пробелы в 18 пронумерованных положений вокруг соединяемых областей, чего было достаточно, чтобы принять фрагменты длины в диапазоне от 6 до 20 остатков без использования кодов остатков. Разница между 18 и 20 заключается в том, что алгоритму необходимы для якорные точки для позиционирования мостиков, но они будут заменены концевыми остатками найденных пептидов. Bridging также заменяет все краевые остатки между якорями на остатки пептида. Для ясности шаблоны, созданные перед использованием Bridging, называются «выкройками» или «схемами объединения» (например, Фигуры 3-7, 12 и 25-28). Поскольку числовой пробел не является пространственным, Bridging также может принимать более мелкие пептидные фрагменты, создавая прерывистую нумерацию.

После того, как выкройки/объединения были созданы, выполняли обширный скрининг линкеров путем прогона моделей через алгоритм Bridging с исчерпывающими комбинациями якорных точек в перекрывающемся скользящем окне вокруг флангов

соединяемых областей. В каждом окне запрашивали пептиды разной длины (от 6 до 20 а.к.). Модели с мостиковым соединением восстанавливаются с помощью команды RepairPDB в FoldX³⁰, а полученные модели ранжируются по глобальной энергии (команда FoldX Stability).

Генерации MutSC1 достигали в несколько стадий: остатки 12'–17' (обратите внимание, что остатки и атомы мономера 2 обозначены ') были удалены, так как они были направлены в сторону от C'-конца и не контактировали с рецептором R1 в рентгенокристаллической структуре; а остатки 18'–156' были перенумерованы на 169–307 и были объединены с первой мономерной последовательностью для создания одноцепочечной молекулы, создавая схему выкройки/объединения 1. В качестве лучших якорных точек нами выбраны остатки 147 (Ile) и 169 (Asn), которые затем соединили с помощью фрагмента из 17 аминокислот из PDB 2wuи (остатки 73–89). Исходная последовательность в 2wuи выбранного сегмента мостика представляла собой LDALFAGVKEA-FGGLD-Y (SEQ ID NO: 340). Остатки LDALFAGVKEA (SEQ ID NO: 341) и последний Y структурно наложены на структуру IL-10 дикого типа. Поэтому мы решили вернуть все эти мутации к исходной последовательности IL-10, за исключением тех случаев, когда ожидалось, что новый остаток улучшит стабильность белка. В этом случае ожидалось, что стабильность будет улучшена за счет мутации Asn169 в Tyr, и поэтому эта мутация поддерживалась.

Вывод значений кинетических данных

Надосадочные жидкости культур бактериальных клеток разводили в среде Хейфлика для корректировки концентрации IL-10, IL-22, IFN-лямбда или SCIL10IL22 в диапазоне от 0,0243 нг мл⁻¹ до 30 нг мл⁻¹, охватывающем динамический диапазон, описанный для НЕК-blueTM (см. «Методы»). Для расчета молярной концентрации для каждого варианта IL-10 предполагалось, что все варианты IL-10 (включая ORF IL-10) имеют молекулярную массу 36 кДа, за исключением MutM, который представляет собой синтетический мономер, описанный в ((Josephson et al., 2001), поэтому его молекулярная масса составляет 18 кДа.

Для вариантов фолдикина-22 молекулярная масса также составляет 36 кДа, но рассматриваются два активных домена. Молекулярная масса SCIL10IL22 составляет 36 кДа, но для каждого интерлейкина учитывается один активный сайт. Изменения оптической плотности при 630 нм, обусловленные различными протестированными концентрациями интерлейкина, были адаптированы к модели насыщения связывания с использованием следующего уравнения:

$$Y = V_{\text{Макс}} * Xh / (KDh + Xh);$$

В этом уравнении K_D — кажущаяся константа диссоциации (поскольку количество активных рецепторов на клетку неизвестно), h — угловой коэффициент Хилла, а B_{Max} — сигнал насыщения. Это уравнение предполагает только специфическое связывание; все неспецифические сигналы были вычтены. Если сигнал насыщения не достигается, B_{Max} устанавливается соответствующим образом для каждого эксперимента.

Использовали по меньшей мере три биологических повтора (и до шести биологических повторов), по два технических повтора для каждого условия. В условиях, когда насыщение не достигалось, для оценки параметров K_D фиксировали B_{Max} . Различные эксперименты анализировали независимо и аппроксимировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9, Excel или Kaleidagraph.

Характеризация клеток CV8 и WT M. pneumoniae, экспрессирующих IL-10.

Для экспрессирующих IL-10 клеток WT и CV8 в культуральный матрас площадью 25 см² (Corning) добавляли 50 мкл исходного инокулята, содержащего 5 мл свежей среды Хейфлика и выращивали в течение 48 часов. Затем культуральную среду собирали, центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 минут и надосадочную жидкость хранили при -80°C для дальнейшего количественного анализа. Клетки соскребали в 1 мл PBS и центрифугировали в течение 5 минут при 10000 об/мин при 4°C; осадки ресуспендировали в 1 мл PBS, центрифугировали в течение 5 минут при 10000 об/мин при 4°C и надосадочные жидкости отбрасывали. Наконец, осадки дезагрегировали в 200 мкл лизирующего буфера (4% SDS, 0,1 М HEPES). Белковые лизаты определяли количественно с использованием набора для анализа белка Pierce BCA (23227, Thermo Fisher) в соответствии с протоколом производителя. Параллельно уровни вариантов IL-10 в супернатантах определяли количественно с помощью ELISA, как описано ранее. Секреционную способность нормировали по биомассе (содержанию белка в общей культуре) для каждого из штаммов. Для каждого анализа выполняли два биологических и два технических повтора.

Эксперименты на мышах / Эксперименты in vivo

Самки или самцы мышей C57Bl/6 (18–20 г) в возрасте от 6 до 8 недель были приобретены у Charles River Laboratories (Франция) и помещены в свободные от патогенов условия в виварии PRBB (регистрационный номер B9900073). Обращение с животными и процедуры соответствовали действующему европейскому (Директива 86/609/ЕЕС) и национальному (Real Decreto 53/2013) законодательству, а также руководящим принципам FELASA и ARRIVE и получили одобрение Комитета по этике экспериментов на животных (Comité de Ética, Experimentación Animal y Bioseguridad) Парка биомедицинских исследований Барселоны (PRBB) и разрешения местного

правительства.

Инфекция легких *M. pneumoniae* у мышей

Штаммы *M. pneumoniae* WT и CV8 культивировали при 37°C, 5% CO₂ в матрасах T75 см² с 25 мл жидкой среды Хейфлика. Через 3-4 дня инкубации (при изменении цвета среды) надосадочную жидкость удаляли, а бактериальные культуры трижды промывали, соскребали и собирали в 10 мл стерильного PBS. Бактериальную суспензию объемом 100 мкл (WT или CV8), содержащую $\sim 0,5-1 \times 10^8$ КОЕ мл⁻¹ ($\sim 0,5-1 \times 10^7$ КОЕ/мышь), использовали для внутритрахеальной (IT) инфекции у мышей, предварительно анестезированных 2% изофлураном. (ISOFLU, Covegan). Через 2 или 4 дня после инокуляции (dpi) животных умерщвляли путем смещения шейных позвонков, а легкие извлекали и обрабатывали. Левое легкое взвешивали и гомогенизировали в соотношении 1:10 (масса/объем) в PBS в стерильных индивидуальных пакетах (Stomacher80, Seward Medical) для количественного определения бактериальной нагрузки, как описано ранее⁵⁵ (предел обнаружения = 0,7–0,9 Log₁₀ КОЕ/легкое). Правое легкое: (i) инсуффлировали 50 мкл 10% стабилизированного метанолом формалина (Panreac) для гистопатологического анализа (посткавальная доля); и (ii) замораживали в N₂ и хранили при –80°C до использования для экстракции РНК (нижняя доля). Контрольным животным инокулировали 100 мкл раствора носителя и параллельно обрабатывали. Заражение проводили в группах по меньшей мере по 5 мышей на линию (n ≥ 5).

Острая инфекция легких, вызванная *P. aeruginosa* PAO1, на модели мышей C57Bl/6

Штамм *P. aeruginosa* PAO1 выращивали при 37°C, 5% CO₂, в течение 14–16 часов в чашках с агаром TSB при 37°C (#BD211825, Fisher Scientific). Бактерии собирали в PBS, а суспензии нормализовали до оптической плотности 600 нм (OD₆₀₀) = 0,5. Для анализа зависимости ответа от дозы для IT-инфекции использовали 100 мкл, содержащих $\sim 1 \times 10^5$ или 1×10^6 КОЕ мл⁻¹ ($\sim 1 \times 10^4$ или $\sim 1 \times 10^5$ КОЕ/мышь, соответственно). Через 24 или 48 часов после инокуляции (hpi) легкие обрабатывали согласно методу, описанному выше. Контрольным животным инокулировали 100 мкл раствора носителя (PBS) и обрабатывали параллельно. Заражение осуществляли группами не менее 5 мышей на линию (n ≥ 5). В этой работе мы создали модель легочной инфекции *Pseudomonas aeruginosa*. Чтобы определить оптимальные условия, мы провели эксперимент «доза-ответ», в котором оценивали бактериальную нагрузку в легких и экспрессию генов маркеров воспаления через 24 и 48 часов после заражения (hpi) (Фигура 17). Извлеченная бактериальная нагрузка была выше через 24 hpi, чем через 48 hpi, что свидетельствует об удалении бактерий с течением времени (Фигура 17А). Кроме того, легкие, инфицированные 105

КОЕ, демонстрировали более высокую бактериальную нагрузку, чем легкие, инфицированные 104 КОЕ, в оба анализируемых момента времени (Фигура 17А). Воспалительная реакция в основном локализовалась в момент 24 hpi (Фигура 17В). В легких, инфицированных 105 КОЕ, наблюдалось значительное увеличение экспрессии *tnf-a*, *kc*, *mir-1a*, *mcp-1* и *il-1b* по сравнению с неинфицированными (PBS) или инфицированными 104 КОЕ группами (все, $p < 0,05$).

Иммуномодулирующий эффект CV8, экспрессирующих hIL-10 in vivo

Для оценки иммуномодулирующего эффекта штаммов *Mycoplasma*, кодирующих hIL-10, мышей C57Bl/6 инфицировали интратрахеально (ИТ) 50 мкл бактериального раствора *P. aeruginosa* PAO1, содержащего $\sim 2 \times 10^6$ КОЕ мл⁻¹ ($\sim 1 \times 10^5$ КОЕ /мышь); и через 2 часа мышей инфицировали ИТ 50 мкл штаммов *Mycoplasma*, содержащих $\sim 2 \times 10^8$ КОЕ мл⁻¹ ($\sim 1 \times 10^7$ КОЕ/мышь), следуя процедурам, описанным выше (Фигура 19А). Контрольных животных обрабатывали параллельно и обрабатывали (i) 2 мкг рекомбинантного белка человеческого IL-10 (hIL-10r) (#200-10, Peprotech) или (ii) стерильным PBS (раствор носителя). Через 24 часа после заражения PAO1 животных умерщвляли и асептически удаляли легкие для описанных выше экспериментов.

Экстракция РНК из цельных легких и количественная ПЦР в реальном времени (RT-qPCR)

Правые легкие, хранившиеся при -80°C , гомогенизировали с помощью Ultra-Turrax (IKA), а тотальную РНК выделяли с помощью набора RNeasy® Mini Kit (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию РНК измеряли спектрофотометрически с использованием Nanodrop One (Thermo-Scientific), а целостность образца РНК подтверждали электрофорезом в 1% агарозном геле. Использовали образцы РНК с соотношением оптической плотности при 260 нм/280 нм, равным 1,8–2,1.

Комплементарную ДНК (кДНК) из цельных клеток легких синтезировали из тотальной РНК (1 мкг) с использованием реагентов обратной транскриптазы SuperScript II (Invitrogen). ПЦР-амплификацию проводили с использованием SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara), а флуоресценцию анализировали с помощью системы ПЦР в реальном времени AriaMx (Agilent Technologies). Показаны пары праймеров для обнаружения *gapdH*, *tnf-a*, *kc*, *mir-1a*, *mcp-1*, *inf-y*, *il-1b* и *nf-kb2* (Таблица 4). Метод $\Delta\Delta\text{Ct}$ использовали для определения относительного содержания мРНК в каждом экспериментальном условии с использованием *gapdH* в качестве эндогенного контроля и нормализацией к значениям, полученным в группе PBS, следующим образом: $\Delta\text{Ct} = \text{среднее значение Ct анализируемого гена} - \text{среднее значение Ct gapdH}$; $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$

обработанной группы - Δ Сt группа PBS; кратное изменение экспрессии мРНК = $2^{-\Delta\Delta$ Сt.

Гистологический и иммуногистохимический (ИГХ) анализ образцов легких

После вскрытия посткавальную долю фиксировали в формалине (Panreac), обрезали и автоматически обрабатывали в этаноле и ксилоле (Leica TP1020 Tissue Processor). После этого ткани заливали в парафин (Tec2900 Histo-Line Workstation), делали срезы толщиной 4 мкм (микротом Leica RM2235) и окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) согласно стандартным процедурам (Leica Autostainer XL).

Препараты вручную наносили на предметные стекла и исследовали с помощью световой микроскопии. Ткани оценивал обученный ветеринарный патологоанатом (руководитель гистопатологического центра Института биомедицинских исследований-IRB Барселоны). В качестве гистопатологических параметров использовали альвеолярно-клеточный инфильтрат и периваскулярно-перибронхиальный/перибронхиолярный инфильтрат и устанавливали количественный балл (0–5: 0 – нет; 1 – минимальный; 2 – легкий; 3 – умеренный; 4 – интенсивный; 5 – очень интенсивный); окончательная оценка каждого образца была получена по сумме обоих параметров. Для ИГХ срезы ткани, залитые в парафин, окрашивали кроличьим моноклональным антителом против F4/80 (D2S9R) XP (#70076S, Cell signalling) в качестве маркера макрофагов⁵⁶ или кроличьим поликлональным антителом против нейтрофильной эластазы (#Ab68672, Abcam) в качестве маркера нейтрофилов⁵⁷ с использованием Leica Bond RX. Специфичность окрашивания подтверждали окрашиванием контролем изотипа IgG кролика (#Ab27478, Abcam). Изображения светлого поля были получены с помощью цифрового сканера NanoZoomer-2.0 HT C9600 (Hamamatsu), оснащенного объективом 20×. Все изображения визуализировали с помощью программного обеспечения NDP.view 2 U123888-01 (Hamamatsu, Photonics, Франция) с использованием гамма-коррекции, установленной на уровне 1,8 на панели управления изображением. Выходные результаты, полученные в результате анализа изображений, были представлены в виде % положительных клеток [% = 100 x (положительные клетки/положительные клетки + отрицательные клетки)].

Статистический анализ

Во всех случаях статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0,05$. Анализы проводили с использованием статистического пакета программного обеспечения Prism (GraphPad Software) и подробно описаны в подписях к каждому чертежу.

Материалы

Список вариантов IL-10, протестированных и описанных в следующих разделах:

- **hIL-10r** (коммерческий белок IL-10, представляет собой природный димер с обмениваемым доменом)

- **WT-IL10/IL-10 ORF** (димер IL-10 с обменяваемым доменом дикого типа, экспрессируемый и секретируемый бактериями, например, *Mycoplasma*)
 - Точечные мутации **Mut1-Mut3** в димере IL-10 с обменяваемым доменом дикого типа
 - **MutSC1 фолдикин_10**, одноцепочечный димер IL-10, в котором сконструированный пептидный линкер ковалентно соединяет N- и C-концы двух молекул димера с заменой в одном из двух 3D-доменов
 - **MutSC2**, то же, что MutSC1, но с точечными мутациями Mut3 в каждой половине последовательности фолдикина (за исключением мутации по остатку 18 во второй половине полипептида).
 - **MutM**, мономерная версия IL10, ранее опубликованная другой группой (Josephson et al., 19).
 - **MutSC1_linkercontrol19** представляет собой фолдикин, в котором сконструированный пептидный линкер MutSC1 заменен линкером poly-Gly той же длины (5 ак) для оценки влияния линкерной композиции на функциональную активность сконструированной молекулы.
 - **MutSC1_controlcenter21** представляет собой контрольную конструкцию на основе MutSC1, в которой новые N- и C-концы были созданы путем разрезания по одному из линкеров, соединяющих два домена фолдикина (положение Asn166). Чтобы сохранить единую цепь, два исходных N- и C-конца, присутствующие в исходной структуре обменяваемого домена, были соединены мостиком с использованием линкерной последовательности, используемой для соединения исходных N- и C-концов в одном из фолдикиновых доменов MutSC1. Эта конструкция используется для оценки влияния наличия только одного из двух центральных линкеров фолдикина MutSC1, так что пара 3D-доменов соединена только одной линкерной последовательностью, а не двумя.
 - **MutIL10_polygly** представляет собой одноцепочечную версию димерного IL-10, в которой N-конец одной последовательности мономера IL-10 связан с C-концом другой последовательности мономера IL-10 с помощью линкера полиGly из 13 остатков, как опубликовано в (Minshawi et al., 2020; <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01794>).

***M. pneumoniae* секретируют функциональные димеры IL-10 с дисульфидными мостиками.**

Сначала мы проверили, может ли *M. pneumoniae* активно экспрессировать сложную молекулу, такую как димер человеческого IL-10 с двумя дисульфидными мостиками. Для

этого мы клонировали человеческий IL-10, объединенный с сигналом секреции mpn142, ранее описанным для *M. pneumoniae*⁵⁸.

С помощью ELISA мы показали, что штамм *M. pneumoniae* WT экспрессировал IL-10 в надосадочной жидкости в концентрации около 2 фг/клетку через 48 часов культивирования (что эквивалентно 2 мкг из культуры 1×10^9 клеток; Таблица 5). С помощью масс-спектрологии (МС) мы подтвердили, что в экспрессированном hIL-10 образуются оба дисульфидных мостика (Таблица 2), что указывает на то, что димер свернут правильно. Затем мы протестировали функциональность полученного IL-10 на предмет его способности: (i) модулировать программу активации первичного противовоспалительного ответа макрофагов человека и (ii) активироваться путем фосфорилирования Tyr705 из STAT3³⁵ с использованием первичной крови, CD14+моноцитов, выделенных от четырех независимых здоровых доноров крови (Методы).

M. pneumoniae, экспрессирующие IL-10 дикого типа (WT), выращивали в течение двух дней, а надосадочную жидкость добавляли к культуре клеток, содержащей около одного миллиона циркулирующих моноцитов (в соотношении 1:5). В качестве положительного контроля добавляли рекомбинантный белок IL-10 человека (hIL-10r) в концентрации 20 нг/мл. Как и ожидалось, обработка моноцитов коммерческим hIL-10r усиливала экспрессию противовоспалительных маркеров (т.е. CD16, CD163 и MerTK) и снижала экспрессию критических провоспалительных рецепторов (т.е. CD86 и MHC2) (Фигура 9А)^{36,37} по сравнению с необработанными клетками. Примечательно, что результаты с использованием IL-10, продуцируемого *M. pneumoniae* (WT_IL-10 ORF), были сопоставимы с результатами с использованием hIL-10r (Фигура 9В). С помощью вестерн-блоттинга мы наблюдали фосфорилирование Tyr705 в STAT3 после 24-часового воздействия на свежевыделенные моноциты надосадочной жидкости *M. pneumoniae*, экспрессирующего IL-10 или hIL-10r (Фигура 9С). В целом эти результаты продемонстрировали, что *M. pneumoniae* способны экспрессировать функциональный человеческий IL-10.

Экспрессия MutSC2 и секреция из эукариотических клеток

Для экспрессии MutSC2 в эукариотических клетках были выбраны клетки Expi293F™.

Клетки Expi293F™ представляют собой клетки человека, полученные из клеточной линии 293F. Их поддерживают в суспензионной культуре и выращивают до высокой плотности в среде для экспрессии Expi293™. Клетки Expi293F™ обладают высокой способностью к трансфекции и обеспечивают более высокий выход белка по сравнению

со стандартными клеточными линиями 293 при транзитной экспрессии белка.

Для экспрессии человеческие клетки Expi293F (Thermo Fisher Scientific) трансфецировали очищенной ДНК и полиэтиленимином (PEI).

Для идентификации секретируемого белка MutSC2 клетки собирали через 3 дня после трансфекции и надосадочные жидкости, содержащие MutSC2, собирали центрифугированием при 13000 об/мин в течение 15 минут. Белок MutSC2 очищали на колонках Nitrap-Ni в автоматизированной быстрой белковой жидкостной хроматографии (FPLC; Äkta avant), концентрировали через центробежные фильтры Amicon 10 кДа (EMD Millipore) и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (PBS) и хранили при - 80°C.

Экспрессия MutSC1 и секреция Escherichia coli

Escherichia coli BL21 трансформировали тремя вариантами вектора pCoofy (KanR), кодирующими IL-10 WT, MutSC1 или MutSC1-his-метку, соответственно. Одну колонию, трансформированную каждым вариантом вектора, собирали и выращивали в течение ночи при 37°C в среде LB с добавлением канамицина. Как только плотность культуры достигает около 0,5 OD, культуру охлаждали до комнатной температуры.

1 мл культуры использовали для подсчета КОЕ в чашках LB; 4 мл культуры индуцировали с использованием IPTG в концентрации 0,5 mM и инкубировали в течение ночи при 20°C. Затем культуры центрифугировали при 3500 g в течение 20 минут и собирали надосадочную жидкость для количественного определения с помощью ELISA. Осадки клеток ресуспендировали в 300 мкл реагента для экстракции белка M-PER (Thermo Scientific). Количественное определение IL-10 проводили с использованием набора ELISA для человеческого IL-10 (Biolegend), а функциональность варианта IL-10 проверяли с использованием репортерных клеток HEK-Blue10 (InvivoGen).

Экспрессия MutSC1 и секреция из Lactococcus lactis

Штамм *Lactococcus lactis* (NZ9000 – repN::nisRK;) и трансформирующий вектор (pNZ8124) приобрели у компании MobiTec (Германия). Клетки выращивали, как указано производителем.

Для электропорации 40 мкл клеток трансформировали 200 нг вектора PNZ8124, кодирующего IL-10 WT или MutSC1. Настройки электропорации были установлены на 2000 В, 25 мкФ, 200 Ом в Biorad Genepulser. Затем добавляли 1 мл G/L-M17B + 20 mM MgCl₂ + 2 mM CaCl₂. Кювету выдерживали 5 мин на льду, инкубировали 1-1,5 ч при 30°C и 100 мкл культуры высевали на 2 сут на агар M17 с глюкозой и 10 нг/мл хлорамфеникола.

Для экспрессии различных белков 5 мл культуры выращивали в течение ночи при 30°C и OD культур доводили до 0,4. 9 мл культуры индуцировали с помощью 1 нг/мл

низина (исходный материал: 1 мг/мл низина в 0,05% уксусной кислоте, Thermo Fisher) и инкубировали в течение 3 часов. Клетки собирали центрифугированием и экспрессированный цитокин/фолдикин в надосадочной жидкости непосредственно определяли количественно с помощью ELISA. Осадок клеток лизировали с помощью 300 мкл реагента для экстракции M-PER (Thermo Scientific). Серийные разведения клеток высевали на чашки со средой для выращивания бактерий для подсчета КОЕ.

Конструирование IL-10 для повышения аффинности к рецепторам

Чтобы преодолеть ограничение потенциальной проблемы более низкой способности *M. pneumoniae* продуцировать белок по сравнению с другими бактериями²², а также иметь возможность предпочтительного уменьшения количества *M. pneumoniae*, вводимых пациенту, авторы изобретения предложили сконструировать мутации в IL-10 с повышенной аффинностью связывания с высоко- и низкоаффинными рецепторами R1 и R2, соответственно. Для создания версий IL-10 с повышенной аффинностью к R1 мы исследовали рентгеновские кристаллические структуры hIL-10, кристаллизованного в комплексе с R1, с хорошим кристаллическим разрешением (PDB 1ybк; 2,5Å).

Затем мы выполнили мутагенезное сканирование остатков комплексного интерфейса *in silico* с помощью команды PositionScan FoldX, которая индивидуально подвергает мутации все R1-контактирующие аминокислоты IL-10 в каждую из остальных 19 природных аминокислот³¹. На основании этого анализа и консервативности последовательностей у разных видов (Фигура 15) мы идентифицировали набор неконсервативных остатков (см., например, Таблицу 1), которые при мутации и моделировании с помощью программы FoldX улучшали связывание с R1 без ущерба для стабильности белка (Таблица 6). Используя выбранные мутации, мы смоделировали два множественных мутанта (Mut1 (SEQ ID NO: 6) и Mut2 (SEQ ID NO: 7), в которых положение 31 IL-10 изменено с Ser на Lys или Arg, соответственно) (Фигура 10). Далее мы проверили независимость мутаций от используемой структуры, моделируя их в других структурах апо-формы IL-10 (PDB 2ilk; 1,6 Å) или голо-формы IL-10 с R1 при более низком разрешении (PDB 1j7v, 2,9 Å) (Таблица 6).

В начале этой работы не было доступной структуры для IL-10, связанного с R2. Поэтому мы объединили мутации Mut2 с дополнительными мутациями IL-10, о которых ранее сообщалось, что они потенциально повышают аффинность взаимодействий между IL-10 и R2 (например, N18I, N92I и K99N)⁹, в результате чего появился Mut3 (SEQ ID NO: 8). При моделировании этих трех мутаций во всех использованных в настоящей заявке структурах IL-10 мы обнаружили, что они снижают стабильность IL-10 (Таблица 6). Совсем недавно стала доступна структура с низким разрешением (6x93; 3,5Å) комплекса

между IL-10 и R1/R2¹⁰. Используя эту структуру для моделирования этих мутаций, мы фактически наблюдали увеличение стабильности IL-10 и увеличение прогнозируемой энергии связи с R2 (Таблица 6). Это увеличение можно объяснить локальными конформационными изменениями в области IL-10, которая взаимодействует с R2 (Фигура 16).

Наконец, мы создали мутанты Mut1–3 и MutM (ранее описанная мономерная форма IL-10²⁵) (Таблица 1); они были клонированы в *M. pneumoniae* (на Фигуре 10 представлен обзор положений мутаций и взаимодействий в структурах).

Измерение значений кажущейся K_D для сконструированных множественных мутантов.

Чтобы оценить относительную аффинность различных вариантов IL-10, мы использовали репортерную клеточную линию (HEK-blueTM), которая содержит репортер секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), который, когда IL-10 связывается с R1 и R2, запускает JAK1/STAT3-опосредованный ответ, приводящий к экспрессии SEAP, которую можно измерить по поглощению при 630 нм. Интенсивность сигнала до насыщения пропорциональна активации STAT3, и кинетическая модель³⁸ может быть аппроксимирована к данным для получения значений кажущейся K_D (см. «Методы»).

Мутанты Mut1 и Mut2 (которые созданы для лучшего связывания с R1) имели схожие значения кажущейся K_D (1,45 e-10 М и 6,45 e-11 М, соответственно), но были лучше, чем ORF IL-10 (1,98 e-10 М), демонстрируя увеличение в 1,4 и 3,0 раза, соответственно. Mut3 на основе Mut2 и включающий мутации, благоприятствующие связыванию R2, приводил к очевидному увеличению K_D (2,61 e-11 М) по сравнению с IL-10-ORF в 8 раз (Фигура 11А). Мы подтвердили, что кажущаяся K_D мономерного IL-10 (MutM) была ниже, чем у ORF IL-10, как описано ранее²⁵ (Фигура 11А и Таблица 7). Уровень экспрессии лучшего мутанта (Mut3) и ORF IL-10 был сходным (Фигура 11В).

Рациональный дизайн одноцепочечного IL-10

Чтобы получить максимально возможное количество/долю активной формы IL-10, нам пришлось свести к минимуму потенциальное секвестрирование экспрессируемого белка из-за деградации, неправильного сворачивания и/или обширной мультимеризации (27). Для достижения этого N-концевую область одного мономера соединили с C-концевой областью другого мономера в димере с заменой (MutSC1) (Фигура 12А). После поиска ModelX Bridging (методы) с использованием Asn18 и Lys157 в качестве якорных точек мы получили 541 модель, в которой была восстановлена боковая цепь; они были ранжированы по энергии с использованием FoldXv5 (30). Затем было установлено, что

лучшей линкерной последовательностью была N157-FGGLD-Y18 (SEQ ID NO: 316), при этом Asn18 был заменен на Tyr, а Lys157 на Asn, и была вставлена последовательность FGGLD (SEQ ID NO: 342). Введя этот линкер, мы удалили N-концевые остатки в одном из двух мономеров кристаллической структуры (остатки с 12 по 17; CTHFPG). После этого мы подвергли мутации остаток Phe после N157 на Asn, чтобы улучшить связывание с R1 (это приводит к NGGLD в виде вставленной последовательности; Фигура 12A) (SEQ ID NO: 318); это улучшило общую стабильность молекулы SC, а также ее связывание с R1 (Таблица 6). Затем мы изменили нумерацию последовательности. Поскольку N-концевая последовательность одного из мономеров, содержащих Cys12, была удалена – которая образует дисульфидный мостик с Cys108 в исходной последовательности ORF IL-10 (новый остаток 259 был удален) – мы подвергли мутации Cys108 на Asn, чтобы предотвратить образование потенциальные ложные дисульфидные мостики. Cys12 и Cys108 остались в структурном эквиваленте другого мономера обмениваемого домена. MutSC2 был создан путем трансплантации мутаций Mut3 в MutSC1 (Фигура 12B).

Полученный полипептид продемонстрировал улучшенную общую стабильность одноцепочечной молекулы, а также ее связывание с R1 (Таблица 6). В результате был получен MutSC1 (Таблица 1). MutSC2 был создан путем трансплантации мутаций Mut3 в MutSC1 (Фигура 12B).

Характеризация сконструированных мутантов IL-10 in vitro.

Весьма важно, что MutSC2 имел лучшую кажущуюся K_D , чем лучший множественный мутант в димере с заменой (Mut3). Чтобы определить важность линкерной последовательности в активности MutSC1 и MutSC2, мы заменили линкерную последовательность N-NGGLD-Y на полиGly-линкерную последовательность N-GGGGG-Y (MutSC1_controlGly). Новый контрольный мутант MutSC1_controlGly продемонстрировал очень значительное снижение активности, что указывает на то, что для короткого линкера важно иметь специфическую последовательность (Фигура 11C), потенциально такую, которая создает особенно полезную структурную конформацию – например, который может придавать конформационную стабильность структуре свернутого димера.

Чтобы выяснить, является ли это улучшение кажущейся K_D MutSC1 и MutSC2 специфичным для типа клеток, использованных в анализе, мы оценили передачу сигналов IL-10 посредством его активации (как показано с помощью вестерн-блоттинга) в двух различных иммунных клеточных линиях: моноцитарной клеточной линии человека THP1 и В-клеточной линии мыши HAFTL. В обоих случаях, когда использовались аналогичные молярные концентрации ORF IL-10, MutSC1 и MutSC2, наблюдалась значительно более

высокая активация для двух мутантов SC по сравнению с ORF IL-10 дикого типа (Фигура 11D).

Чтобы получить количественную оценку кажущейся K_D , мы оценили фосфорилирование STAT3 при стимуляции лигандом с помощью FACS в двух разных клеточных линиях, используя мышинные HAFTL и человеческие BLaER1 (клеточная линия лейкоза из В-клеток-предшественников). По сравнению с ORF IL-10, мутанты MutSC1 и MutSC2 значительно превосходили по активации p-STAT3 (Фигуры 11E и F). В целом сконструированные мутанты MutSC1 и MutSC2 привели к повышению аффинности и максимальной активности в различных типах клеток человеческого и мышинного происхождения. Как и в случае с клетками HEKblue, MutSC2 был примерно в два раза лучше, чем MutSC1.

В целом, эти результаты подтвердили идею о том, что гомодимер IL-10 с заменой, продуцируемый *Mycoplasma*, представляет собой смесь развернутых мономерных и активных димерных форм. Таким образом, преобразование димера с заменой в одноцепочечную молекулу (например, Фигура 3) является эффективной стратегией увеличения в бактериях количества не только секретируемого белка, но (что более важно) секретируемого активного белка.

Характеризация базового штамма CV8 in vivo

Было показано, что *M. pneumoniae* вызывает воспалительную реакцию в легких мышей^{17,39}. Чтобы исследовать этот ответ, мы создали аттенуированный штамм *M. pneumoniae*, называемый в настоящей заявке базовым CV8 (заявка на патент EP 20382207.7), в котором нуклеаза MPN133 (mpn133⁴⁰) и токсин CARDS (mpn372)⁴¹ удалены, а глицеральдегид -3-фосфатдегидрогеназа GlpD (mpn051)⁴² заменяется GpsA (см. «Методы»), ферментом со схожей метаболической активностью, но продуцирующим H₂O, а не H₂O₂.

Вирулентность CV8 была протестирована на мышинной модели интратрахеальной инфекции легких (Фигура 13). Сходные бактериальные нагрузки наблюдались для штаммов WT и CV8 в обе анализируемые точки времени (Фигура 13A), что позволяет предположить, что удаление факторов вирулентности не поставило под угрозу колонизирующую способность штаммов *Mycoplasma*. Профиль воспаления легких анализировали с помощью RT-qPCR (Фигура 13B) через 2 дня после инокуляции (dpi); в частности, на данный момент мы ранее показали, что бактериальная нагрузка все еще значительна, но есть достаточно времени для воспалительной реакции⁵⁸. По сравнению с неинфицированной контрольной группой (с использованием PBS) штамм WT повышал экспрессию *tnf-a*, *kc*, *mir-1a*, *mcp-1* и *il-1b* (все, $p < 0,05$) (Фигура 13B и Таблица 8). В

случае CV8 существенно изменилась только экспрессия *tnf-1a* по сравнению с контролем PBS ($p < 0,05$), но она все равно оставалась на более низком уровне, чем у штамма WT.

Чтобы подтвердить ослабление базового штамма, мы проанализировали гистологические данные в легких (Фигура 13C). Штамм WT способствовал наличию альвеолярного и перибронхиального/перибронхиолярного инфильтрата как на 2, так и на 4 день после инокуляции ($p < 0,05$ для обоих) по сравнению с контролем PBS. В легких, инфицированных CV8, мы также наблюдали перибронхиальный/перибронхиолярный инфильтрат, но на более низком уровне, чем тот, который наблюдался для штамма WT в оба анализируемых момента времени (оба, $p < 0,05$). Эти результаты соответствовали ослабленному фенотипу CV8. Поэтому мы создали ORF CV8_IL-10, CV8_MutSC1 и CV8_MutSC2, чтобы проверить их иммуномодулирующее действие *in vivo*. Важно отметить, что мы не наблюдали существенных различий ни в производстве функциональной ORF IL-10 (Фигура 13C) штаммами WT или CV8, ни в активности любого из секретируемых мутантов по сравнению со штаммом WT (Фигура 13D).

Сконструированные варианты IL-10 проявляют мощные иммуномодулирующие эффекты in vivo.

Мы разработали и использовали инфекционную модель *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (см. «Методы») в качестве инструмента *in vivo* для изучения свойств отрицательной регуляции вариантов IL-10, полученных в этой работе (Фигура 17).

Чтобы проверить противовоспалительные свойства сконструированных мутантов IL-10, экспрессируемых базовым штаммом CV8, мы инфицировали мышей C57Bl/6 1×10^5 КОЕ штамма PAO1, а через 2 часа - 1×10^7 КОЕ штамма *Mycoplasma* (CV8, CV8_IL-10 ORF, CV8_MutSC1 или CV8_MutSC2). Мыши контрольной группы получали PBS (в качестве отрицательного контроля) или 2 мкг hIL-10г (в качестве положительного контроля) (Фигура 14A).

Сначала мы проанализировали количество легочных бактерий PAO1 и микоплазмы (Фигура 14B). Никаких существенных различий к моменту 24 hpi между анализируемыми группами не наблюдалось, что исключает то, что различия в экспрессии воспалительных генов были обусловлены бактериальной нагрузкой, присутствующей в легких.

Затем мы проанализировали воспалительный профиль (Фигура 14C, 14D). Действительно, заражение PAO1 привело к значительному увеличению экспрессии маркеров воспаления. Что касается штамма CV8, мы могли наблюдать незначительную воспалительную реакцию при использовании отдельно (Фигура 14C), которая усиливалась при совместном введении PAO1 + CV8 (Фигура 14C, 14D). Введение 2 мкг белка hIL10г мышам, инфицированным PAO1 (PAO1 + hIL-10г), значительно снижало экспрессию *tnf-a*

и *mir-1a* (оба, $p < 0,01$) с аналогичной тенденцией для *msr-1* ($p = 0,1$), *inf-y* ($p = 0,08$) и *il-1 β* ($p = 0,06$) (Фигура 14C, 14D). В отличие от результатов, наблюдаемых для группы, получавшей hIL-10r, CV8, кодирующий IL-10 WT (CV8_IL-10 ORF), существенно не модулировал экспрессию анализируемых маркеров воспаления (Фигуры 14C, 14D). Инокуляция CV8_MutSC1 или CV8_MutSC2 снижала экспрессию маркеров воспаления (Фигура 14C). В отличие от того, что мы наблюдали *in vitro*, свойства MutSC1 и MutSC2 различались *in vivo*, при этом MutSC1 оказался более эффективным кандидатом (Фигура 14C, 14D). Эффекты MutSC1, экспрессируемого штаммом CV8, были сопоставимы или даже лучше, чем при введении 2 мкг hIL-10r.

Примечательно, что при гистопатологическом анализе инфицированных легких мы не обнаружили серьезных различий в анализируемых параметрах тканей (Таблица 9). Мы наблюдали важный клеточный инфильтрат с преобладанием нейтрофилов (ПМН) во всех группах, инфицированных PAO1 (Фигура 14E, 14F), как описано ранее⁴³. Мы обнаружили значительное снижение количества PMN в клеточном инфильтрате животных, получавших MutSC1, и снижение (которое, однако, не было значимым) у получавших MutSC2, по сравнению с группой PAO1 + PBS (Фигуры 14E, 14F).

Таким образом, комбинация базового штамма *M. pneumoniae* CV8 с спроектированными вариантами IL-10 показала свой иммуномодулирующий потенциал *in vivo*, при этом MutSC1 является наиболее многообещающим кандидатом.

Обсуждение

Системное введение IL-10 людям для лечения различных патологий, таких как воспалительные заболевания кишечника, аллергическая астма и солидные опухоли, было проверено в различных клинических исследованиях, но не дало клинических результатов у этих пациентов из-за различных проблем⁴. Ограничения включают низкую концентрацию IL-10 в целевой ткани или точное расположение ткани, необходимое для того, чтобы IL-10 имел желаемый противовоспалительный эффект и при этом избегал системной токсичности.

Использование живых биотерапевтических продуктов, кодирующих IL-10, может быть эффективной стратегией повышения локальной концентрации IL-10 в целевой ткани, поскольку, по сути, это представляет собой микросамовоспроизводящийся минимальный аппарат, похожий на фабрику по производству лекарств, которую легко удалить с помощью антибиотиков, когда их действие завершено. Стратегии, основанные на местной доставке IL-10 *in situ*, были изучены для некоторых бактерий, таких как *L. Lactis* или *Bifidobacterium bifidum*, при воспалительных заболеваниях кишечника (IBD), с некоторыми предварительными многообещающими результатами в клинических

испытаниях^{44,45}. Однако доставка белков человека бактериями также может быть затруднена сворачиваемостью секретируемой молекулы, необходимостью образования дисульфидных мостиков и/или образования димера (или более высокого олигомера) для получения функционального белка. Это случай IL-10, который представляет собой гомодимерный белок с заменой с двумя дисульфидными мостиками.

В этой работе мы сконструировали человеческий IL-10 для оптимизации его экспрессии и эффективности при экспрессии бактерией *in vivo*. Конечная цель состояла в том, чтобы снизить возможную бактериальную патогенность за счет уменьшения бактериальной дозы, вводимой пациенту, при сохранении противовоспалительных свойств IL-10. Чтобы продемонстрировать улучшенные свойства наших сконструированных молекул IL-10 («фолдикинов»), мы выбрали легкие в качестве органа-мишени. Этот выбор был сделан на основе сообщений, показывающих, что экзогенная доставка IL-10 облегчает различные заболевания легких^{14,15,46}, а также потому, что легкие являются более инфицируемым органом, чем кишечник, из-за уменьшенного размера микробиома²⁸.

Здесь мы продемонстрировали, что легочная бактерия человека *M. pneumoniae* способна секретировать функциональный IL-10 с дисульфидными мостиками, демонстрируя активность, сравнимую с активностью рекомбинантного белка IL-10 человека (hIL-10r).

Инфицирование легких даже непатогенными бактериями может вызвать воспалительную реакцию, поэтому чем меньше бактерий используется, тем лучше. Поскольку *M. pneumoniae* обладает ограниченной способностью к синтезу белка, одним из способов снижения дозы, вводимой в легкие для терапии, является повышение активности секретируемых молекул. Этого можно добиться, увеличив аффинность IL-10 к его рецепторам и/или улучшив его стабильность и способность к сворачиванию^{9,29}.

Здесь мы разработали множественные мутантные цитокины, такие как варианты IL-10 и IL-22 (как описано в настоящей заявке), используя комбинацию интеллектуального дизайна, программных алгоритмов (ModelX, FoldX) и данных из литературы (например, для разработанных мутаций, присутствующих в Mut3), а также одноцепочечные мутанты, связывающие N- и C-концы (фолдикин MutSC1), которые демонстрировали значительно лучшую кажущуюся K_D *in vitro*, которая была еще лучше, когда были включены комбинации отдельно полезных наборов мутаций (например, в фолдикине MutSC2). Более того, фолдикины MutSC1 и MutSC2 экспрессировались на уровнях около в 4 раза выше, чем ORF IL-10 или Mut3. Сочетая более высокую экспрессию и лучшую выраженность K_D , штамм WT *Mycoplasma*, экспрессирующий MutSC2, имеет около в 60 раз

относительно более высокую активность *in vitro*, чем штамм ORF IL-10.

В соответствии с этим, штамм CV8, экспрессирующий IL-10 MutSC1 и MutSC2 *in vivo*, продемонстрировал значительный эффект отрицательной регуляции в отношении воспаления при инфекции *P. aeruginosa* по сравнению со штаммом CV8, экспрессирующим ORF IL-10 или с введением 2 мкг белка hIL-10r. Однако, хотя мы заметили, что MutSC2 работал лучше, чем MutSC1 в некоторых анализах *in vitro*, мы видим противоположную тенденцию *in vivo*. Это может быть связано с небольшой разницей в кажущейся K_D между двумя мутантами (примерно в два раза) или, что более вероятно, с тем фактом, что сконструированные в настоящей заявке мутации были созданы с использованием человеческого рецептора R1, который отличается в некоторых взаимодействующих с IL-10 положениях по сравнению с мышинным рецептором R1, в котором проводились анализы *in vitro*.

Одноцепочечные молекулы с димерными 3D-структурами не только приводят к увеличению функционального белка при секреции бактериями, но и позволяют создавать асимметричные молекулы для нацеливания на конкретный тип клеток. Это можно принять во внимание при проектировании новых одноцепочечных вариантов путем структурного проектирования каждой из двух взаимодействующих поверхностей одиночной молекулы отдельно.

В целом, мы создали живую биотерапевтическую базу для доставки бактериями оптимизированных цитокинов (таких как IL-10) в легочную ткань, которая подавляет воспалительную реакцию в инфекционном контексте, тем самым устраняя предыдущие ограничения на эффективную доставку цитокинов *in vivo* и прокладывая путь к успеху клинических испытаний.

Предполагается, что за счет соответствующих последовательностей и структурных модификаций концепция фолдикинов, продемонстрированная выше для фолдикинов IL-10 и IL-22, может быть применима ко многим другим цитокинам, как описано в других местах настоящего документа, например (A) Спиральные цитокины класса I, которые можно подразделить на длинноцепочечные спиральные (IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTGF, LIF, OSM и CSF3) или короткоцепочечные спиральные (IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, IL13, IL15 и IL21, TSLP, CSF1 и CSF2); и (B) цитокины класса II, включая IL10-подобные цитокины (IL10, IL19, IL20, IL22, IL24, IL26, IL28A, IL28B и IL29), интерфероны IFN α типа I (IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17 и IFNA21), IFN ω (IFNW1), IFN ϵ (IFNE), IFN κ (IFNK) и IFN β (IFNB1).

Таблицы

Генетическая часть	Последовательность	Тип	SEQ ID NO:
P3	TATTGCATAAATATTGTATAAATATTGTATAAATAAAAATA	ДНК	2
S142	ATGAAGTCCAAGTTGAAACTCAAACGCTATTTACTCTTTCTCCCCTT GTTACCACTCGGTACCTTGAGTTTAGСТААСАСТТАСТТГТТАСАА	ДНК	3
IL-10 ORF	Для целей нумерации Ser во втором положении считается остатком 1 MSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF ¹ SRVKTFFQMKDQLDNL LLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNS LGENLKT ¹ LRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKN ¹ AFNKLQEKGIYKAM SEFDIFIN ¹ YIEAYMTMKIRN	белок	4
MutM	Для целей нумерации Ser во втором положении считается остатком 1 MSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF ¹ SRVKTFFQMKDQLDNL LLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNS LGENLKT ¹ LRLRLRRCHRFLPCENGGGGGGKSKAVEQVKN ¹ AFNKLQEK GIYKAMSEFDIFIN ¹ YIEAYMTMKIRN*	белок	5
Mut1	Для целей нумерации Ser во втором положении считается остатком 1 MSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLREAFRRVKTFFQMKDQLDLSL LLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNS LGENLKT ¹ LRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKN ¹ AFNKLQEKGIYKAM SEFDIFIN ¹ YIEAYMMMIRN	белок	6
Mut2	Для целей нумерации Ser во втором положении считается остатком 1 MSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLREAFKRVKTFFQMKDQLDLSL LLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNS LGENLKT ¹ LRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKN ¹ AFNKLQEKGIYKAM SEFDIFIN ¹ YIEAYMMMIRN	белок	7
Mut3	Для целей нумерации Ser во втором положении считается остатком 1 MSPGQGTQSENSCTHFPGILPNMLRDLREAFKRVKTFFQMKDQLDLSL LLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVIS LGENLNT ¹ LRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKN ¹ AFNKLQEKGIYKAM SEFDIFIN ¹ YIEAYMMMIRN	белок	8
MutSC1	Для целей нумерации Met в первом положении считается остатком 5 MTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF ⁵ SRVKTFFQMKDQLDNL ⁵ LLKES LLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENL KT ⁵ LRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKN ⁵ AFNKLQEKGIYKAMSEFDI FIN ⁵ YIEAYMTMNGGLDYLPNMLRDLRDAF ⁵ SRVKTFFQMKDQLDNL ⁵ LKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSL GENLKT ⁵ LRLRLRRNHRFLPCENKSKAVEQVKN ⁵ AFNKLQEKGIYKAMS EFDIFIN ⁵ YIEAYMTMKIRN	белок	9
MutSC2	Для целей нумерации Met в первом положении считается остатком 5 MTQSENSCTHFPGILPNMLRDLREAFKRVKTFFQMKDQLDLSLLKES LLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVISLGENL NT ⁵ LRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKN ⁵ AFNKLQEKGIYKAMSEFDI FIN ⁵ YIEAYMTMNGGLDYLPNMLRDLREAFKRVKTFFQMKDQLDLSL ⁵ LKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVISL GENLNT ⁵ LRLRLRRNHRFLPCENKSKAVEQVKN ⁵ AFNKLQEKGIYKAMS EFDIFIN ⁵ YIEAYMMMIRN	белок	10

Ключ:

ID	Мутации (нумерация 1убк PDB)
IL-10 ORF	WT IL-10 человека
MutM	Сконструированный мономер IL-10, который имеет петлю polyGly, вставленную между остатками Asn116 и Lys117 в ORF IL-10.
Mut1	DL28E,SL31R,NL45S,TL155M
Mut2	DL28E,SL31K,NL45S,TL155M
Mut3	DL28E,SL31K,NL45S,TL155M,NL18I,NL92I,KL99N
MutSC1	Одноцепочечный, созданный в этой работе, соединяющий N- и C-концы с помощью спроектированной петли остатков FGGLDY (SEQ ID NO: 1), мутированной на NGGLDY (SEQ ID NO: 13).
MutSC2	D179E D28E; S182K S31K; N45S N196S; T155M T306M; N18I; N243I N92I; K99N K250N (MutSC1 в качестве основы)

Таблица 1. В этой таблице описаны различные конструкции, созданные в соответствии с настоящим раскрытием, а также штаммы, в которых были реализованы различные конструкции. Для каждой генетической конструкции мы включили аминокислотную или нуклеотидную последовательность. В данной работе был проанализирован Список вариантов IL-10. Эталонной молекулой является несконструированный IL-10 дикого типа в качестве исходного каркаса. Для мутантов 1 (Mut1), 2 (Mut2) и 3 (Mut3) положение и цепь перечисленных мутантных остатков соответствует нумерации PDB. Цепь L содержит IL-10. Варианты MutSC1, MutSC2 представляют собой одноцепочечные молекулы, созданные в данной работе («фолдикины»). MutSC2 основан на MutSC1 и включает точечные мутации, показанные в Mut3. Мутации в MutSC2 дублируются, поскольку были объединены два идентичных домена, за исключением положения 18, поскольку мутации этого положения не были совместимы с петлей, созданной для создания одной молекулы.

Уровень пептидов				IL10-WT	IL10-WT	IL10-WT
				LysC-трипсин	Tryp_GluC	LysC_Chym
Ди-сульфид	Учетные названия базовых белков	Аннотированная последовательность	Модификации	Области: F12: Образец	Области: F7: Образец	Области: F6: Образец
	IL10WT	[K].AHVNSLGENLK.[T]		3,10E+07		
	IL10WT	[K].ESLLEDFK.[G]		5,60E+07	1,90E+05	2,20E+06
	IL10WT	[K].DQLDNLLK.[E]		7,40E+07	2,20E+06	6,40E+06
	IL10WT	[E].VMPQAENQDPDIK.[A]			3,20E+07	
	IL10WT	[E].SLLEDFK.[G]			7,10E+05	
Cys62	IL10WT	[E].DFKGYLGCCQAL SE.[M]	1×Карба-мидометил [C8]		4,40E+06	
Cys12	IL10WT	[E].NSCTHFPGNLPNMLR.[D]	1×Карба-мидометил [C3]		1,60E+06	
	IL10WT	[K].DQLDNLLK.[S]			5,50E+06	

IL10WT	[Y].LEEVMPPQAENQDP DIK.[A]					
IL10WT	[F].YLEEVMPQAENQD PDIK.[A]					8,00E+06

Таблица 2А

Ди- суль- фид	Учетные названия базовых белков	Аннотированная последователь- ность	Модифика- ции	LysC- трипсин Области: F13: Образец	MutSC2	
					LysC_Chym Области: F8: Образец	LysC_GluC Области: F9: Образец
	MutSC2	[Y].LEEVMPPQAEN QDPDIK.[A]			1,60E+07	
	MutSC2	[Y].LEEVMPPQAEN QDPDIK.[A]	1×Окисле- ние [M5]		1,80E+06	
	MutSC2	[F].YLEEVMPQAE NQDPDIK.[A]			8,70E+07	
	MutSC2	[F].YLEEVMPQAE NQDPDIK.[A]	1×Окисле- ние [M6]		1,10E+07	
	MutSC2	[K].ESLLEDFK.[G]		1,60E+08	4,80E+07	3,40E+07
	MutSC2	[K].DQLDSLKLLK. [E]		1,80E+08	4,00E+07	2,80E+07
Cys 62	MutSC2	[Y].LGCQALSEMI QF.[Y]	1×Карбами- дометил [C3]		8,40E+05	
	MutSC2	[K].AHVISLGENLN TLR.[L]		1,90E+08		
	MutSC2	[K].AHVISLGENLN TLRLR.[L]		2,90E+05		
Cys 12	MutSC2	[M].TQSENSCTHF PGILPNMLR.[D]	1×Карбами- дометил [C7]	5,80E+06		
	MutSC2	[E].VMPQAENQDP DIK.[A]				5,70E+07

Таблица 2В

Таблица 2А и 2В. Протеомный анализ надосадочных жидкостей выбранных штаммов *Mycoplasma* (WT IL-10 и MutSC2, экспрессируемых *M. pneumoniae* WT, для идентификации дисульфидных мостиков. Подробности протокола, соблюдаемого в лаборатории протеомики с использованием трех различных процедур расщепления, описаны в разделе «Методы»: Таблица 2А – сульфид IL-10 дикого типа и Таблица 2В – сульфид MutSC2. В каждом из них мы показали различные пептиды, обнаруженные после расщепления, и их возможные химические модификации, если они будут обнаружены. Наличие карбамидометила означает, что цистеин пептида является частью дисульфидного мостика. Пептидные последовательности в Таблице 2А сверху вниз представляют собой SEQ ID NO: от 19 до 28, соответственно; пептидные последовательности в Таблице 2В сверху вниз представляют собой SEQ ID NO: 27, 27, 28, 28, 20, 21, 29-32 и 22. Аминокислотные остатки, указанные в квадратных скобках, не входят в состав пептидной

последовательности. LysC расщепляется протеазой LysC. Химотрипсин, расщепляется химотрипсином. GluC расщепляется протеазой GluC. Трипсин, расщепляется трипсином. Когда два названия появляются вместе, это означает, что использовались обе протеазы. Сравнительный протеомный анализ был проведен для сульфид-содержащего MutSC1, и потенциальные остатки цистеина дисульфидного мостика были идентифицированы в положениях Cys12 и Cys62 (данные не показаны).

Антиген	Номер клона	Поставщик
CD16	3G8	Biolegend
MerTK	590H1 1G1E3	Biolegend
CD163	GH1/61	Biolegend
B7-H1 PD-L1	MIH2	Biolegend
CD86	IT2.2	Biolegend
HLA-DR	1.243	Biolegend
CD16/32(FcBlock)	93	Biolegend
STAT-3	D1A5	Cell Signaling Technology
P-STAT3	D3A7	Cell Signaling Technology
Анти-актин	20-33	Sigma-Aldrich

Таблица 3. Список антител, использованных в работе. Для каждого из них мы указываем описание клона и поставщика.

Ген	Ориентация	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:	Источник
<i>gapdH</i>	F	CCCACTAACATCAAATGGGG	33	Regueiro et al., 2011
	R	CCTTCCACAATGCCAAAGTT	34	
<i>tnf-α</i>	F	AGGCACTCCCCCAAAGA	35	Euba et al., 2017
	R	GCTCCTCCACTTGGTGGTTT	36	
<i>kc</i>	F	GACAGACTGCCTTGATGGCA	37	Euba et al., 2017
	R	TGCACTTCTTTTCGCACAAC	38	
<i>mip-1α</i>	F	CCCAGCCAGGTGTCATTTTCC	39	Wang et al., 2019
	R	GCATTCAGTTCAGGTCAGTG	40	
<i>mcp-1</i>	F	CTTCTGGGCCTGCTGTTC	41	Kei Goto et al., 2016
	R	CCAGCCTACTCATTTGGGATCA	42	
<i>inf-γ</i>	F	CTGGCAAAGGATGGTGAC	43	Программное обеспечение Primer3
	R	GCTGATGGCCTGATTGTCTT	44	
<i>tlr2</i>	F	CTCCTGAAGCTGTTGCGTTAC	45	Wang et al., 2019
	R	GCTCCCTTACAGGCTGAGTTC	46	
<i>il-1β</i>	F	GCTGCTCCAAACSTTTGAC	47	Shen et al., 2018
	R	AGCTTCTCCACAGCCACAAT	48	
<i>il-4</i>	F	GCAACGAAGAACACCACAGA	49	Программное обеспечение Primer3
	R	GCAACGAAGAACACCACAGA	50	
<i>il-6</i>	F	TGATGCACTTGCAGAAAACA	51	Leili et al., 2019
	R	GGTCTTGGTCTTAGCCACTC	52	
<i>il-12p40</i>	F	CAGCACCAGCTTCTTCATCAG	53	Happel et al., 2005
	R	TCTTCAAAGGCTTCATCTGCAA	54	
<i>il-18</i>	F	ACTGTACAACCGCAGTAATACG	55	Brieland et al., 2000
	R	AGTGAACATTACAGATTTATCCC	56	
<i>il-23</i>	F	TGCTGGATTGCAGAGCAGTAA	57	Kei Goto et al.,

	R	GCATGCAGAGATTCCGAGAGA	58	2016
$\Delta glpD$ v2	F	G*T*T*G*CCGTCTTGTAACAGG	59	Эта работа
	R	[BtnTg]- AAAATAAGGGTTAATTGGTAAACC	60	
$\Delta Puro$	F	G*T*G*A*GCACAATCAGCGCTCAAAC TG	61	Эта работа
	R	[BtnTg]-GTAAGTTATCGAGGTGACTTAC	62	

Таблица 4 Список праймеров, использованных в работе. Для каждого из них мы указываем ориентацию, последовательность, ссылку на источник и показываем любые присутствующие химические модификации (*: фосфортиооатное основание, BtnTg: биотинилированный 5'-конец).

Данные нормализованы	источник R2	R3 нормализованный (применяется коэффициент *1/60)	R4 нормализованный (применяется коэффициент *2)	Среднее	Станд. откл	Кратное изменение
IL-10 ORF (фг/клетку)	3,542092857	0,810555702	3,71E+00	2,6869789	1,328565237	1
Mut3 (фг/клетку)	4,043921687	1,372270192	3,30E+00	2,9040929	1,125366579	1,0808
MutSC1 (фг/клетку)	10,49550595	10,7686619	8,34E+00	9,8666104	1,088271667	3,67201

Таблица 5. Способность секреции белка IL-10 в пересчете на клетку (*M. pneumoniae* WT) дикого типа и вариантов (IL-10 ORF, Mut3 и MutSC1) в различных биологических повторах (R2, R3 и R4). Для каждого из них мы интегрировали колониеобразующие единицы (КОЕ), подсчитанные для каждого матраса, с концентрацией IL-10, оцененной для каждого из надосадочных жидкостей с помощью ELISA (см. «Методы»). Мы скорректировали значения экспрессии, выбрав в качестве эталона экспрессию MutSC1 на клетку (фг/КОЕ) в R2.

Мутант	Модель	DDG Стабильности	DDG взаимодействия с R1	DDG взаимодействия с R2	DDG Стабильности комплекса
Mut1	2ilk	-5,92			
Mut2	2ilk	-5,25			
Mut3	2ilk	-1,45			
Mut1	1y6k	-5,58	-7,64		-10,22
Mut2	1y6k	-4,25	-2,66		-6,71
Mut3	1y6k	-1,30917	-2,2395		-2,83119
Mut1	6x93	-2,05981	0,74141	-0,4357	-3,13052
Mut2	6x93	-2,23692	1,3284	-0,2881	-1,55588
Mut3	6x93	-2,4908	-0,2762	-1,3807	-4,46315

Таблица 6. Расчеты энергии с использованием FoldXv5 (см. Методы). Значения указаны в ккал/моль. Для каждого из мутантов (Mut1, Mut2 и Mut3) рассчитаны энергии взаимодействия с R1 и R2 независимо и энергия стабильности в апо-форме и комплексе (Сводный анализ). Энергии были рассчитаны в трех независимых моделях PDB (2ilk, 1y6k и 6x93).

	Вmax сред- нее	sd Вmax	Сред- нее Хилла	sd Хилла	Среднее кажущееся K _D (M)	sd App. K _d	Кратное изменение - кажущееся K _D	Биологи- ческие реплики
IL-10 ORF	1,89	0,43	1,55	0,77	1,98E-10	9,24E-11	1,00E+00	5
MutM	1,63	0,37	3,38	2,48	2,56E-10	8,77E-11	7,73E-01	2
Mut1	2,19	0,47	1,25	0,50	1,45E-10	6,59E-11	1,37E+00	3
Mut2	1,57	0,32	1,21	0,22	6,45E-11	1,73E-11	3,07E+00	3
Mut3	1,97	0,44	1,63	0,75	2,61E-11	1,49E-11	7,59E+00	6
MutSC1	1,73	0,18	1,40	0,33	1,90E-11	5,12E-12	1,04E+01	4
MutSC2	1,76	0,15	1,26	0,21	1,20E-11	2,80E-12	1,65E+01	3
rIL-10	1,51	0,01	2,12	0,83	4,61E-10	1,67E-10	4,30E-01	2

Таблица 7. Характеризация ex vivo кинетических параметров вариантов IL-10, полученных в этой работе, экспрессируемых и секретируемых *M. pneumoniae*. Вверху мы показываем среднее и стандартное отклонение различных кинетических параметров из нескольких биологических повторов (внизу).

ID	Кратное изменение генной экспрессии мРНК (2 ^{-ΔΔCt})					
	2 dpi			4 dpi		
	PBS	WT	CV8	PBS	WT	CV8
<i>tnf-a</i>	1 ± 0,39	7,89 ± 4,32 *	2,35 ± 1,61	1 ± 0,21	0,74 ± 0,62	0,64 ± 0,3
<i>kc</i>	1 ± 0,58	3,94 ± 0,73 *	3,86 ± 0,56 #	1 ± 0,27	1,48 ± 0,39	0,83 ± 0,1
<i>mip-la</i>	1 r 0,6	25,3 ± 7,02 *	12,05 ± 0,53	1 ± 0,13	7,24 ± 4,41	2,54 ± 0,74
<i>mcp-1</i>	1 r 0,6	14,7 ± 6,65 *	7,11 ± 2,95	1 ± 0,36	6,03 ± 2,96	2,20 ± 0,34
<i>ii-lb</i>	1 ± 0,76	7,24 ± 4,93 *	6,43 ± 1,47	1 ± 0,54	3,76 ± 2,32	4,02 ± 0,85
<i>inf-y</i>	1 ± 0,78	9,27 ± 13,46	6,66 ± 2,61	1 ± 0,54	5,47 ± 3,65	3,78 ± 0,4

Статистический анализ осуществляли с помощью одностороннего дисперсионного анализа + критерия множественных сравнений Тьюки

* p < 0,05 относительно контроля, в эквивалентной временной точке

p < 0,05 WT относительно CV8, в эквивалентной временной точке

Таблица 8. Экспрессия генов маркеров воспаления в легких, инфицированных *M. pneumoniae* WT или CV8. Мышей C57Bl/6 инфицировали 100 мкл, содержащими 10⁷ КОЕ/мышь, и умерщвляли через 2 или 4 дня после инфекции (dpi). Контрольную группу (PBS) обрабатывали 100 мкл растворов носителя. Показания этих репортерных клеток измеряются как поглощение при 630 нм (см. «Методы») и пропорциональны способности каждого из вариантов IL-10 активировать рецепторы IL-10 (R1 и R2). Количественные

данные ELISA и значения поглощения, полученные с помощью НЕК-blue, представлены на разных листах для каждого повтора. Все кинетические данные, полученные на основе этих результатов (V_{max} , константа Хилла (h) и KD), были рассчитаны с помощью кинетической модели (см. «Методы») с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Каждый из рассчитанных параметров представлен на листе «Интегрированная таблица». В тех экспериментах, где насыщение не было достигнуто, V_{max} был установлен на максимальное значение V_{max} в том же биологическом повторе и отмечен звездочкой.

Гистологическое заключение		Группы							
		PBS	PAO1+ PBS	PBS+ CV8	PAO1+ CV8	PAO1 + CV8_ ORF	PAO1 + CV8_ MutSC1	PAO1 + CV8_ MutSC2	PAO1 + hIL10h
Н&Е	Клеточная инфильтрация	2,1 ± 0,2	3,33 ± 0,47 *	2,88 ± 0,22	3,25 ± 0,56*	3,75 ± 0,43*	3,0 ± 0,35	3,63 ± 0,41*	3,33 ± 0,47*
	Инфильтрация периваскулярных/перибронхиальных клеток	0 ± 0	3,5 ± 0,41 *	2,0 ± 0,35 *, #	3,63 ± 0,41*	3,63 ± 0,41*	2,75 ± 0,56*	3,75 ± 1*	3,33 ± 0,47*
	PMN в просвете бронхов/бронхиол	0 ± 0	3 ± 0 *	0,25± 0,63#	0,63 ± 0,65#	1,88 ± 0,74*	1 ± 0,71*, #	1 ± 0,71*, #	1,67 ± 0,47*
	Общий балл (A+B+C)	2,1 ± 0,2	9,83 ± 0,85*	5,13 ± 0,74*, #	7,50 ± 1,27*	9,25± 1,09*	6,75 ± 1,03*, #	8,38 ± 0,96*	8,33 ± 1,25*
ГХ	NE (% положительных клеток)	4,9 ± 1,15	28,02 ± 2,44*	2,56± 0,95#	20,81 ± 8,74*	26,81 ± 8,74*	12,01± 2,3#	17,63 ± 1,18	19,46 ± 3,92
	FA (% положительных клеток)	10,77±5,4	61,86± 5,89*	11,13± 0,38#	44,3± 0,47*	51,19± 3,21*	40,68± 5,44	42,30± 4,43*	44,48 ±11,09 *
Статистическое сравнение проводили с использованием Однофакторного дисперсионного анализа + апостериорного критерия Тьюки *p<0,05 по сравнению с PBS; # p<0,05, по сравнению с PAO1 + PBS									

Таблица 9. Гистологические находки наблюдались в легких, инфицированных PAO1 и обработанных CV8, кодирующим варианты IL-10. Контрольным мышам инокулировали PBS или белок hIL-10г. Окрашивание гематоксилином и эозином (Н&Е) использовали для оценки клеточной инфильтрации (оценка: 0–5), периваскулярной/перибронхиальной инфильтрации (оценка: 0–5) и PMN в просвете бронхов/бронхиол (оценка 0–5). Общий балл (оценка: 0–15) рассчитывался по сумме всех параметров. Иммуногистохимию использовали для количественного определения нейтрофилов (нейтрофильной эластазы) или макрофагов (FA). Более низкий балл означает

менее воспалительный или патогенный фенотип.

Оценка влияния сконструированных линкеров в Фолдикине-10.

Конструкции и дизайны

Выше мы описали новую молекулу под названием MutSC1 со следующей аминокислотной последовательностью:

MutSC1 (SEQ ID NO: 9)

```

MTQENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPO
      hhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
              HA
AENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFLP CENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINY
hhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhhh      hhhhhh
              HC              HD              HE
IEAYMTMNGGLDYLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYEEV
hhhhhhhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
      HF              HA              HB
MPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRNHRFLP CENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIF
hhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhhh      hhh
              HC              HD              HE
INYIEAYMTMKIRN
Hhhhhhhhhhh
HF

```

Последовательность, подчеркнутая жирным шрифтом, соответствует пептидному линкеру, который был разработан для соединения С- и N-концов двух доменов мономеров. Мы выделили жирным курсивом последовательность, являющуюся частью двух структурированных линкеров дикого типа (CENKSKA; SEQ ID NO: 168) между 3D-доменами. В случае IL-10, который представляет собой природный «димер с заменой», эти линкерные последовательности являются природными структурированными линкерами и придают характерный угол складки (V-форму) между двумя доменами фолдикина (или между левым и правым доменами димера IL-10 дикого типа. Мы создали контрольный образец, в котором последовательность NGGLD (SEQ ID NO:318) была заменена полиGly-линкером той же длины (5aa) для оценки влияния линкерной композиции на функциональную активность сконструированной молекулы (подчеркнуто). В результате образуется молекула под названием MutSC1_polyglycontrol_19.

> MutSC1_polyglycontrol_19 (SEQ ID NO: 63)

```

MTQENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPO
      hhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
              HA
AENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFLP CENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINY
hhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhhh      hhhhhh
              HC              HD              HE
IEAYMTMGGGGGYLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYEEV
hhhhhhhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
      HF              HA              HB
MPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRNHRFLP CENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIF
hhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhhh      hhh
              HC              HD              HE
INYIEAYMTMKIRN
Hhhhhhhhhhh
HF

```

Чтобы оценить важность наличия двух линкеров между каждым 3D-доменом по сравнению с одним линкером, а также важность жесткости V-формы в центре молекулы, были синтезированы и проанализированы следующие контрольные полипептиды: А) Мы продублировали N-С концевой линкер одного 3D-домена в другой домен фолдикина, так что каждый домен образован из непрерывной первичной последовательности, и для создания новых N- и С-концов полипептида мы разрезали положение Asn166 в одном из двух линкеров между 3D-доменами (см. подчеркнутые последовательности в MutSC1 и MutSC1_control_center21, показывающие новый конец и выделенные жирным курсивом, а также два неприродных линкера от N- к С-концу (жирный шрифт). Таким образом, в отличие от фолдикинов по настоящему изобретению (как описано в других местах настоящего документа), фолдикин «MutSC1_control_center21» имеет только один структурный линкер, охватывающий левый и правый 3D-домены в свернутом белке.

```

>MutSC1_controlcenter_21 (SEQ ID NO: 64)
KSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYLEAYMTMNFFGGLDYLPNMLRDLRDAFSR
hhhhhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhh
HD HE HF HA
VKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNS
hhh hhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhh
HB HC
LGENLKTLRLRLRRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYLEAYM
hhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhhhh
HD HE HF
TMNFFGGLDYLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDDFKGYLGCQALSEMIQ
hhh hhhhhhhhhh hhhhh hhhhhhhhhhhhh
HA HB
FYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRRCHRFLPCEN
hhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
HC

```

Результаты

Три различные конструкции вставили в геном *Mycoplasma pneumoniae* посредством транспозона (Tn4001, CmR) под контролем синтетического промотора (p3) (<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00239-7> и сигнала секреции (s142_OPT)(<https://doi.org/10.15252/msb.202010145>). *M. pneumoniae* выращивали в среде Хейфлика в течение 48 часов, после чего собирали надосадочные жидкости и рассчитывали концентрацию различных сконструированных молекул с помощью ELISA. Во всех трех случаях концентрация надосадочной жидкости превышала 30 нг/мл, максимальную концентрацию, входящую в динамический диапазон клеток HEK-BLUE-IL10.

Первую аппроксимацию функциональности молекул осуществляли путем оценки активности неразбавленной надосадочной жидкости в репортерных клетках HEK-blue. Все три конструкции активировали сигнальный путь STAT3 (см. Фигуру 18).

Затем мы выполнили 8 серийных разведений, начиная с 30 нг/мл (каждое разведение 0,5X) и оценили активацию голубых клеток НЕК-blue (см. Фигуру 18В). Мы сопоставили модель Михаэлиса-Ментен с экспериментальными данными (связывание по насыщению, специфическое связывание с угловым коэффициентом Хилла, фиксация V_{max} на уровне 2,3) и получили кажущуюся KD . Когда сконструированная петля была заменена линкером полиGly того же размера, активность этого мутанта резко снизилась (MutSC1_linkercontrol19/MutSC1_polyglycontrol_19). Когда N- и C-концевой линкер был введен в оба 3D-домена (с образованием новых N- и C-концов между доменами фолдикина), активность упала примерно в 2,5 раза (MutSC1_linkercontrol 21 / MutSC1_controlcenter_21).

Приведенные выше результаты позволяют предположить, что для оптимальной функциональности фолдикинов очень важны одновременно как правильный аминокислотный состав введенного линкера на N- и C-концах, так и наличие двух линкерных пептидов, образующих мостики между соседними 3D-доменами.

Пример 2: Получение фолдикинов из мономерных цитокинов класса II с тремя сконструированными линкерами.

Перечень вариантов IL-22, протестированных и описанных в следующих разделах. Каркасы фолдикина IL-22 основаны на схеме, изображенной на фигурах 5 и 27.

- IL22 WT, мономерный IL22 на основе IL22 xtal, экспрессируемого в бактериях, например. *M. pneumoniae* (PDB= 3dlq)
- Hydroph_core-1, мономерный IL22 с мутациями T56L, A66M, V95I, T99F, S173L
- Hydroph_core-2, мономерный IL22 с мутациями T56M, A66M, V95I, T99F, S173L, N68Q
- CtoA, IL22 WT с Cys в положении 7, замененным на Ala
- Точечная мутация T56M в мономерном IL22
- Точечная мутация A66M в мономерном IL22
- Точечная мутация V95I в мономерном IL22
- Точечная мутация T99F в мономерном IL22
- Точечная мутация S173L в мономерном IL22
- фолдикин-22_1 (SCIL22_1) (SEQ ID NO: 65) одноцепочечный димер IL-22, в котором сконструирован линкер для соединения N- и C-концов одной из последовательностей мономера IL-22, после чего была создана димерная единица путем объединения этого мономера с другой последовательностью мономера IL-22

с помощью разрыва последовательности петли в каждой последовательности мономера и соединения соответствующих новых N- и C-концов с образованием межмономерных мостиковых линкеров (как показано, например, на фигурах 5 и 27), как поясняется ниже.

- фолдикин-22_3 (SCIL22_3) (SEQ ID NO: 66) одноцепочечный фолдикин, аналогичный фолдикин-22_1, но имеющий другую сконструированную линкерную последовательность между одним из новых N- и C-концов, и в котором остаток Cys в положении 2 из SEQ ID NO: 65 заменен остатком Val.
- фолдикин-22_3_linkerNCpolygly/фолдикин-22_3_NCpolygly включает два сконструированных линкера, соединяющих левый и правый 3D-домены, но заменяет спроектированный/сконструированный линкер между N- и C-концами с polyGly-Ser. Точная длина сконструированного линкера сохранялась в новом линкере poly-Gly-Ser.
- фолдикин-22_3_centralinkers сохраняют линкер между N- и C-концами фолдикин-22_3 (SCIL22_3), но заменяет два центральных линкера, соединяющих левый и правый 3D-домены с poly-Gly-Ser. Мы сохранили точную длину сконструированного линкера при замене его на poly-Gly-Ser.

Конструкции и Проекты: Создание одноцепочечного IL-22

Человеческий IL-22, естественно, представляет собой мономерный интерлейкин. Мы превратили IL-22 в фолдикин (называемый «фолдикин-22»), используя комбинацию интеллектуального проектирования и программного обеспечения ModelX и FoldX, как описано при разработке фолдикина на основе IL-10 (называемого в данной заявке «фолдикин-10»). Поскольку IL-22 в природе не является димером с обмениваемым доменом, для образования фолдикин-22 необходимо было создать два неприродных мостика между отдельными мономерами, а также связать N- и C-концы одного из мономеров. Два мостика между отдельными мономерами создаются путем размыкания петли в каждом мономере и перекрестного связывания мономеров в каждой из открытых последовательностей (между соответствующими новыми N- и C-концами), что описано и проиллюстрировано со ссылкой на Фигуры 5 и 27. Два новых мостика между мономерами обозначены подчеркиванием и двойным подчеркиванием в последовательностях ниже. Поскольку эти мостики не расположены в идентичных положениях и не объединяют идентичные последовательности, каждая последовательность линкера может быть отличной, что проиллюстрировано в воплощениях ниже. Были созданы две разные конструкции мутантов, отличающиеся одной из последовательностей линкера (одинарное подчеркивание), а также имеющие Cys₂, мутировавший в Val в одном случае (жирный

шрифт, подчеркивание). Жирным шрифтом мы выделили спроектированную последовательность ANGT (SEQ ID NO: 329), связывающую N- и С-концы одного из 3D-доменов. Мостиковыми линкерами между левым и правым доменами фолдикина являются: TCMPGGSKT (SEQ ID NO: 337) и RLELLP (SEQ ID NO: 331) в фолдикин-22_1 и NRLKKLMASSD (SEQ ID NO: 332) и RLELLP (SEQ ID NO: 331) в фолдикин-22_3. Для простоты поиска структурно консервативные спирали в фолдикине 22 помечены в том порядке, в котором они находятся в исходной последовательности IL-22 WT (т.е. HA, HB...), а спиральные сегменты — h. Если спиральный сегмент представляет собой слегка искаженную спираль и поэтому некоторые остатки не обозначаются как h в swisspdb, но окружены правильными спиральными сегментами, то это обозначается как h-Nres-h, где Nres может обозначать любое количество остатков, обозначенных как -. Спиральные сегменты определяются с помощью программного обеспечения swisspdb и могут незначительно отличаться по длине в зависимости от программного обеспечения, используемого для их определения, а также от кристаллической структуры.

>SCIL22_1 (фолдикин-22_1) (SEQ ID NO: 65)

GCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFT
 hhhhhhhhhhhhhhhhhh hhh hhhhhhhhhhhhh
 HA HB
 LEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCMPGGSKTHIQRVQKLDKTVKKGESGE
 h---hhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh hhh
 HC HD
 IKAIGELDLLFMSLRNACI**ANGT**LDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKL
 hhhh hhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhh hh
 HE HF HA
 FHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSRLELLPHIQR
 h hhhhhhhhhhhhhh hhh hhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhh
 HB HC
 NVQKLDKTVKKGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
 hhhhhhhhhhhh hhhhhh hhhhhhhhhhhh
 HD HE HF

>SCIL22_3 (фолдикин-22_3) (SEQ ID NO: 66)

GVRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFT
 hhhhhhhhhhhhhhhhhh hhh hhhhhhhhhhhhh
 HA HB
 LEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLKKLMASSDHIQRNVQKLDKTVKKGESGEIK
 h---hhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh hhh
 HC HD
 AIGELDLLFMSLRNACI**ANGT**LDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFH
 hhhh hhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhh hh
 HE HF HA
 GVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSRLELLPHIQRNV
 h hhhhhhhhhhhhhh hhh hhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhh
 HB HC
 QKLDKTVKKGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

hhhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhhhh
 HD HE HF

Для дальнейшего изучения важности сконструированных линкерных последовательностей мы создали ряд дополнительных мутантных конструкций фолдикинов на основе каркаса фолдикин-22_3: первая, фолдикин-22_3_linkerNCpolygly, сохраняет последовательность двух сконструированных линкерных мостиков фолдикин-22_3, но меняет линкер между N- и C-концами на полиGly. Другая конструкция (фолдикин-22_3_centralinkers) сохраняет линкер между N- и C-концами (жирный шрифт), но заменяет два центральных линкерных мостика между 3D-доменами на poly-Gly-Ser (серый). В обоих случаях мы сохраняли точную длину сконструированного линкера при замене его на poly-Gly или poly-Gly-Ser, соответственно.

> фолдикин-22_3_linkerNCpolygly (SEQ ID NO: 67)

GVRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEE
 VLFPSQDRFQPYMQEVVVPFLARLSNRLKKLMASSDHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELD
 LLFMSLRNACI **GGGG**LDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCY
 LMKQVLNFTLEEVLFPSQDRFQPYMQEVVVPFLARLSNRLSSRLELLPHIQRNVQKLKDTVKKLGE
 SGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

> фолдикин-22_3_centralinkers (SEQ ID NO: 68)

GVRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEE
 VLFPSQDRFQPYMQEVVVPFLARLSGGSGSGSGGSHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELD
 LLFMSLRNACI –
ANGTLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLE
 EVLFPSQDRFQPYMQEVVVPFLARLSNRLSGGSGSGSHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELD
 LLFMSLRNACI

Стабилизация гидрофобного ядра IL-22 в связанном состоянии

Параллельно мы внедрили в каркас IL-22 некоторые мутации, которые, как было спрогнозировано на основе моделирования гидрофобного ядра, стабилизировали гидрофобное ядро в связанной конформации. Те аминокислотные замены, которые, как ожидалось, обеспечат повышение стабильности и которые не сохранялись на 100% в ходе эволюции у разных видов, были особенно желательны. Каждую потенциальную мутацию оценивали индивидуально и в комбинации.

Кристаллографическая структура и последовательность, которые были выбраны в качестве эталона для расчета изменений стабильности при мутации гидрофобного ядра, представляли собой 3dlq.PDB. Мы идентифицировали остатки T56, A66, V95, T99 и S193 как те, которые при мутации потенциально могут стабилизировать белок IL22. Эти остатки отмечены серым цветом в последовательности WT Pdb (SEQ ID NO: 69).

3dlq. Последовательность Pdb (SEQ ID NO: 69)

```

ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTL
        hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh            hhh            hhhhhhhhhhhhhhhhh
                HA                                HB
EEVLFPSQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEI
---hhhh         hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh            hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh     hhhh
                HC                                HD                                HE
KAIGELDLLFMSLRNACI
hhh  hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                HF
  
```

В Таблице 10 ниже мы перечисляем 5 мутантов, спрогнозированных с помощью FoldX для стабилизации гидрофобного ядра IL22.

Название	Мутант
56	T56M
66	A66M
95	V95I
99	T99L
173	S173L

Таблица 10: стабилизирующие мутации в гидрофобном ядре IL-22

Затем мы ввели гидрофобные мутации индивидуально и коллективно в конструкциях фолдикин-22, описанных выше.

3dlq. Последовательность Pdb - белок, стабилизированный гидрофобным ядром (56) (SEQ ID NO: 343)

```

ARLDKSNFQQPYITNRMFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTL
        hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh            hhh            hhhhhhhhhhhhhhhhh
                HA                                HB
EEVLFPSQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEI
---hhhh         hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh            hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh     hhhh
                HC                                HD                                HE
KAIGELDLLFMSLRNACI
hhh  hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                HF
  
```

3dlq. Последовательность Pdb - белок, стабилизированный гидрофобным ядром (66) (SEQ ID NO: 344)

```

ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEMSLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTL
        hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh            hhh            hhhhhhhhhhhhhhhhh
                HA                                HB
EEVLFPSQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEI
---hhhh         hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh            hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh     hhhh
                HC                                HD                                HE
KAIGELDLLFMSLRNACI
hhh  hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                HF
  
```

3dlq. Последовательность Pdb - белок, стабилизированный гидрофобным ядром (95) (SEQ ID NO: 345)

```

ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQILNFTL
      hhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhh             hhhhhhhhhhhhhhh
              HA                                 HB
EEVLFPQSDRFQPYMQEVVFPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEI
---hhhh       hhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhh
              HC                                 HD                                 HE
KAIGELDLLFMSLRNACI
hhh   hhhhhhhhhhhhhhhhh
      HF
  
```

3dlq. Последовательность Pdb - белок, стабилизированный гидрофобным ядром (99) (SEQ ID NO: 346)

```

ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFMFL
      hhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhh             hhhhhhhhhhhhhhh
              HA                                 HB
EEVLFPQSDRFQPYMQEVVFPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEI
---hhhh       hhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhh
              HC                                 HD                                 HE
KAIGELDLLFMSLRNACI
hhh   hhhhhhhhhhhhhhhhh
      HF
  
```

3dlq. Последовательность Pdb - белок, стабилизированный гидрофобным ядром (173) (SEQ ID NO: 347)

```

ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTL
      hhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhh             hhhhhhhhhhhhhhh
              HA                                 HB
EEVLFPQSDRFQPYMQEVVFPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGEMGEI
---hhhh       hhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhh
              HC                                 HD                                 HE
KAIGELDLLFMSLRNACI
hhh   hhhhhhhhhhhhhhhhh
      HF
  
```

3dlq. Последовательность Pdb - белок, стабилизированный гидрофобным ядром (IL-22hydC) (SEQ ID NO: 70)

```

ARLDKSNFQQPYITNRMFMLAKEMSLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQILNFMFL
      hhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhh             hhhhhhhhhhhhhhh
              HA                                 HB
EEVLFPQSDRFQPYMQEVVFPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGELGEI
---hhhh       hhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhh
              HC                                 HD                                 HE
KAIGELDLLFMSLRNACI
hhh   hhhhhhhhhhhhhhhhh
      HF
  
```

Сконструированные мутации интерфейса IL-22

Доступна кристаллографическая структура мышинового IL-22, связанного с

рецепторами R1 и R2 (6we0.pdb). Мы создали гуманизованную модель этой кристаллографической структуры, используя программное обеспечение FoldX для мутации остатков, которые различаются у мыши и человека, а также программное обеспечение ModelX для моделирования небольших движений основной цепи, чтобы при необходимости лучше учитывать различия в аминокислотах. После получения структур IL-22 человека и мыши с рецепторами R1 и R2 мы провели анализ сканирования положений с помощью FoldX для каждого положения, контактирующего с рецепторами. Затем мы проанализировали энергию взаимодействия с обоими рецепторами и стабильность комплекса. Мы выбрали те положения, которые могут способствовать связыванию с рецепторами как человека, так и мыши.

В Таблице 11 ниже мы перечисляем различные положения, проанализированные в структуре человека, DDG в стабильности комплекса и DDG взаимодействия с R1 и R2, соответственно. Указанные значения представлены в ккал/моль.

Мутант	DDG Стабильности Комплекса	DDG Взаимодействия IL22-R1	DDG Взаимодействия IL22-R2
A123Y	-2,16	0,00	-2,32
D43D,S45H	3,21	0,00	0,13
D43D,S45K	-0,07	0,00	-0,32
D43D,S45N	0,26	0,00	-0,51
D43D,S45Q	0,88	0,00	0,10
D43D,S45R	0,49	0,00	-0,33
D43E,S45H	3,89	0,00	-0,09
D43E,S45K	1,76	-0,02	-0,47
D43E,S45N	1,87	-0,02	-1,01
D43E,S45Q	2,67	-0,02	0,01
D43E,S45R	2,13	-0,05	-0,53
D43H	4,28	0,00	-0,20
D43H,S45H	7,22	0,00	-0,37
D43H,S45K	3,27	0,00	-0,56
D43H,S45N	4,27	0,00	-1,23
D43H,S45Q	3,96	0,00	-0,15
D43H,SZ45R	3,82	0,00	-0,82
D43N,S45H	3,40	0,00	-0,01
D43N,S45K	1,90	-0,01	-1,08
D43N,S45N	3,10	0,00	-0,10
D43N,S45Q	1,44	0,00	-1,22

D43N,S45R	2,24	0,01	-1,19
D43Q,S45H	4,43	0,00	0,03
D43Q,S45K	3,11	-0,02	-0,71
D43Q,S45N	3,10	0,00	-1,44
D43Q,S45Q	3,43	0,00	-0,02
D43Q,S45R	3,52	-0,03	-0,93
E77Y	-0,56	-1,74	0,00
K162K	-0,05	0,01	0,00
K61E	0,50	-0,94	0,04
K61H	-0,30	-0,90	-0,01
K61W	-0,73	-1,18	0,02
N176E	0,47	0,14	-0,01
N68Q	0,62	-0,03	0,00
N97Q	-0,21	0,00	0,01
Q116R	-0,06	0,00	0,21
Q116W	0,11	0,00	-1,08
Q116Y	0,44	0,00	0,08
Q48L	-0,75	-0,26	-0,11
Q49S	-0,47	-0,05	0,57
R128K	-0,48	0,00	0,41
S45R	0,49	0,00	-0,36
S64E	0,07	-2,56	0,00
S64M	-1,11	-0,65	0,00
T70I	-0,98	-1,55	0,00
K61W,S64K		2,24	
K61W,S64M		-1,94	

Таблица 11: Положения остатков в IL-22 человека, которые влияют на стабильность и взаимодействие с R1 и R2.

В таблице 12 ниже мы перечисляем различные проанализированные положения в структуре мышей, DDG в стабильности комплекса и DDG взаимодействия с R1 и R2, соответственно. Указанные значения представлены в ккал/моль.

Мутант	DDG Стабильности Комплекса	DDG Взаимодействия IL22-R1	DDG Взаимодействия IL22-R2
Q48L	-1,39	-0,57	-0,11
K61E	0,50	-0,80	-0,18
K61H	-0,42	-1,25	0,01

K61W	-0,94	-1,52	0,03
S64M	-1,74	-0,82	0,00
Q116W	0,35	0,00	-0,36
Q116Y	0,35	0,00	0,10
Q116R	-0,51	0,00	-0,09
N176E	0,46	0,25	-0,05
E43H	1,15	-0,03	-0,78
S45R	-0,33	-0,08	-1,17
Q49S	-1,14	-0,03	-0,84
N68Q	0,00	0,09	0,00
N97Q	-0,15	0,00	0,00
Q128K	0,18	0,00	-0,17
S64E	1,68	0,22	-0,01
T70I	0,09	-0,21	0,00
E77Y	-0,22	-1,06	0,00
K162K	0,00	0,00	0,00
Q128Y	0,60	0,00	0,00
E43D,S45H	-0,17	-0,07	-1,46
E43D,S45R	-0,63	0,00	0,48
E43D,S45Q	-0,65	-0,02	0,19
E43D,S45K	-1,03	0,00	0,65
E43D,S45N	0,17	-0,02	1,93
E43E,S45H	1,01	-0,07	-1,70
E43E,S45R	-1,00	-0,03	-1,77
E43E,S45Q	0,77	0,00	-0,28
E43E,S45K	0,29	0,00	0,80
E43E,S45N	1,70	0,00	0,18
E43H,S45H	2,73	-0,10	-1,00
E43H,S45R	0,49	-0,08	-1,83
E43H,S45Q	1,80	-0,04	-0,44
E43H,S45K	0,95	-0,04	-0,27
E43H,S45N	2,36	-0,04	-1,04
E43Q,S45H	1,88	-0,09	-2,04
E43Q,S45R	0,52	-0,11	-2,24
E43Q,S45Q	1,55	-0,03	-1,02
E43Q,S45K	0,91	-0,07	-1,70
E43Q,S45N	1,75	-0,03	-1,01

E43N,S45R	1,24	-0,04	-0,59
E43N,S45Q	1,43	-0,04	-0,38
E43N,S45K	0,67	-0,04	-0,39
E43N,S45N	1,30	-0,04	-1,54
E43N,S45H	1,60	-0,10	-2,10

Таблица 12: Положения остатков в мышином IL-22, которые влияют на стабильность и взаимодействие с R1 и R2.

С помощью этих элементов мы выбрали серию комбинаций мутаций, которые будут изучены в первую очередь на IL-22 WT. Ниже мы можем найти последовательность мутантов с сконструированным интерфейсом.

В таблице 13 (ниже) указаны мутации, внесенные в последовательность IL-22 дикого типа, которые повышают как стабильность IL-22, так и взаимодействие с его рецептором. Мутации были реализованы в IL-22 WT и дополнительно включены в каркасы фолдикин-22 (частичное выравнивание последовательностей дикого типа и мутантов С-Е показано ниже).

mutantC_IL22	A132Y, D43E, S45R, E77Y, T70I;	SEQ ID NO: 71
mutantD_IL22	K61B, C64M	SEQ ID NO: 72
mutantE_IL22	A132Y, D43E, S45R, E77Y, T70I, K61W, S64M;	SEQ ID NO: 73

Таблица 13: мутации IL-22, повышающие стабильность

WT22 (SEQ ID NO:317)

APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDR
FQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLDKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI

мутант C_IL22 (SEQ ID NO: 71)

APISSHCRLKRNRFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGYKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDR
FQPYMQEVVPFLYRLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLDKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI

мутант D_IL22 (SEQ ID NO: 72)

APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAWEAMLADNNTDVRLIGKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDR
FQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLDKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI

мутант E_IL22 (SEQ ID NO: 73)

APISSHCREDRSNFQQPYITNRTFMLAWEAMLADNNTDVRLIGYKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDR
FQPYMQEVVPFLYRLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLDKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI

• **Результаты экспериментов**

Анализ влияния состава линкерного белка на функциональность белка IL-22

Замена линкера N-С-концов фолдикина IL-22 линкером polygly (фолдикин-22_3_linkerNCpolygly) или центральными линкерами (фолдикин-22_3_centrallinkers)

привела к полной потере функции белка, что подтверждает идею о том, что сконструированный состав линкера в значительной степени влияет на аффинность к белку (см. фигуру 19).

Анализ мутаций, стабилизирующих гидрофобное ядро IL-22

Для мутаций, введенных в каркас IL-22 ($K_D = 1,7e-11$), мы наблюдали увеличение измеренного K_D , что, как предполагается, связано со стабилизацией этого белка в связанном состоянии при введении мутаций, стабилизирующих ядро, в гидрофобный каркас ($K_D = 5,4e-12$) (Фигура 20).

Мы также проанализировали влияние каждого из мутантов отдельно и сравнили с IL-22 WT. Когда аминокислота Cys2 на N-конце последовательности фолдикина-22 (фолдикин-22) была мутирована для предотвращения образования дисульфидного мостика, мы наблюдали полную потерю функции. Несмотря на это, когда оценивали различные одиночные мутации в гидрофобном ядре, мы наблюдали повышение аффинности белка к трем из пяти мутаций в положениях 66, 95 и 99 (Фигура 21). Мы заметили, что мутация в положении 173 является вредной, а мутация в положении 56 кажется нейтральной. Это может объяснить, почему у множественного гидрофобного мутанта было достигнуто только двукратное увеличение аффинности. Следовательно, будущая версия IL-22 и фолдикина-22 может включать три мутации: 66, 95 и 99. Наши результаты показывают, что стабилизация гидрофобного ядра белка фолдикина (или мономерного белка) в связанном состоянии может быть успешной стратегией повышения аффинности белка (Фигура 21).

Анализ мутаций, улучшающих взаимодействие с рецепторами R1 и R2.

Анализировали влияние мутаций, предназначенных для улучшения взаимодействия между IL-22 и R1 (мутант C_IL22, SEQ ID NO: 71), R2 (мутант D_IL22, SEQ ID NO: 72) и обоими (мутант E_IL22, SEQ ID NO: 73). Наблюдали 10-кратное увеличение аффинности к мутанту E_IL22 по сравнению с диким видом (app K_D 3.37E-11 против 1,28E-10) и двукратное увеличение аффинности к мутанту D_IL22.

Анализ вариантов фолдикина-22.

Мы вставили различные конструкции в бактериальный геном с помощью транспозона (Tn4001, TcR), как описано в разделе «Способы». Бактериальные клетки (например, *M.pneumoniae*, *L.lactis* или *E.coli*) выращивали в среде Хейфлика в течение 48 часов, после чего собирали надосадочные жидкости и рассчитывали концентрацию различных сконструированных молекул IL-22 с помощью ELISA. Во всех трех случаях концентрация надосадочной жидкости превышала 30 нг/мл, максимальная концентрация, входящая в динамический диапазон клеток HEK-BLUE-22.

Первую аппроксимацию функциональности молекул осуществляли путем оценки активности неразбавленной надосадочной жидкости в репортерных клетках НЕК-blue (см. Фигуру 22А). Из этих молекул IL-22, фолдикин-22-1 и фолдикин-22_3 продемонстрировали способность активировать опосредованный IL-22 сигнальный путь через STAT3. Конструкция, в которой линкер N-С-концов фолдикина22 был заменен линкером poly-Gly (фолдикин-22_3_linkerNCpolygly), не активировала сигнальный путь, что позволяет предположить, что такая конструкция неактивная (фигуры 19 и 22В).

Затем мы выполнили 8 серийных разведений, начиная с 30 нг/мл (каждое разведение 0,5X) и оценили активацию клеток НЕК blue (см. фигуру 22В). Мы подогнали модель Михаэлиса-Ментен к экспериментальным данным (связывание по насыщению, специфическое связывание с коэффициентом Хилла, фиксация Вmax на уровне 2,2) и получили кажущийся K_d . Кажущиеся значения K_D показаны на панели В. Оба фолдикина показали увеличение K_D около в 4 раза по сравнению с IL-22 WT, что подтверждает улучшение активности фолдикина-22 по сравнению с IL-22 дикого типа.

Химерный IL-10/IL-22

Список химерных вариантов химерного фолдикина IL-10/IL-22, протестированных и описанных в следующих разделах:

- **Фолдикин 10-22.** Химерный фолдикин, соединяющий IL-10 и IL-22, где IL-10 соответствует закрытому/непрерывному 3D-домену фолдикина, а IL-22 - открытому/разделенному домену. (SEQ ID NO: 74).
- **Химера 3 / Фолдикин 10-22_3** основана на фолдикине 10-22, в котором остаток Cys в положении 1 заменен остатком Ala. (SEQ ID NO: 75)
- **Химера 5 / Фолдикин10-22_5** основана на Фолдикине 10-22_3, в котором была сделана группа из 5 дополнительных аминокислотных замен в попытке повысить стабильность расщепленного 3D-домена IL-22 для улучшения активности белка IL-22 (SEQ ID NO: 76).
- **Гетеродимер 10-22.** Контроль, при котором сконструированный мономерный IL-10, описанный в (Josephson et al., 2000), объединен с IL-22 с помощью короткого линкера gly-ser из шести аминокислот, соединяющего С-концы IL-10 с N-концами IL-22.
- **Гетеродимер22-10.** Контроль, сконструированный мономерный IL-22 объединен с мономерным IL-10, описанным в (Josephson et al., 2000), с помощью короткого линкера gly-ser из шести аминокислот, соединяющего С-концы IL-22 с N-концами IL-10.

ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYMLLQVLNFTLEEV
LFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLDPKAAFCKKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFIN
YIEAYMTMNFGLDYLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCLCLSE
MIQFYLEEVMPOAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFLPCISKVLRNRNVQKLKDTV
KLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI*

>фолдикин10-22_5 (SEQ ID NO: 76)

ARLDKSNFQQPYITNRLFMLAKEASLMDNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYMLLQILNFFLEEV
LFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLDPKAAFCKKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFIN
YIEAYMTMNFGLDYLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCLCLSE
MIQFYLEEVMPOAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFLPCISKVLRNRNVQKLKDTV
KLGESGEIKAI GELDLLFMLLRNACI

Мутации этой молекулы представлены ниже

Идентификатор	Мутации исходного SCIL1022
Фолдикин10-22 3	C1A
Фолдикин10-22 5	C1A, S314L, T60F, V56I, A27M, T17L

В качестве контроля мы создали два разных химерных белка. Сконструированный мономерный IL-10, описанный в (Josephson et al., 2000) (подчеркнуто ниже), объединенный с IL-22 (курсив) посредством короткого линкера gly-ser из шести аминокислот (heterodimer10-22) (SEQ ID NO: 77). Параллельно мы создали инвертированную конструкцию (heterodimer22-10), в которой С-конец IL-22 (курсив) был объединен с N-концом IL-10 (подчеркнуто) посредством короткого линкера gly-ser из шести аминокислот (SEQ ID NO: 78). Линкер выделен жирным шрифтом и подчеркнут в SEQ ID NO: 78 ниже.

>heterodimer10-22 (SEQ ID NO: 77)

MSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCCQ
ALSEMIQFYLEEVMPOAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFLPCENGGGKSKAVEQ
VKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN**GGSGGS**APISSHCRLDKSNFQQPYITN
RTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEV
VPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI

>heterodimer22-10 (SEQ ID NO: 78)

APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLN
FTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEI
KAIGELDLLFMSLRNACI**GGSGGS**MSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMK
KDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCCQALSEMIQFYLEEVMPOAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLR
RLRRCHRFLPCENGGGKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN*

Результаты

Для оценки функциональности сконструированных молекул мы сначала начали с количественного определения с помощью ELISA концентрации в надосадочной жидкости культуры клеток различных версий при экспрессии и секреции бактерией (например, *M. pneumoniae*, *L. Lactis* или *E. coli*). Для количественного определения различных химер мы использовали антитела, распознающие IL-22 с помощью ELISA, поскольку мы обнаружили, что коммерческое антитело, которое мы использовали для распознавания

человеческого IL-10 (набор Deluxe Human IL-10 ELISA, Biolegend), не распознает его в химере IL-10/IL22.

Затем мы оценили функциональность молекул, используя параллельно две линии репортерных клеток. Первая, клетки HEK-Blue™ IL-22, происходящие из клеточной линии HEK293 эмбриональной почки и предназначенные для обнаружения биоактивного IL-22 человека и мыши. Вторая линия репортерных клеток HEK-Blue™ IL-10 также обнаруживает биоактивный интерлейкин 10 человека и мыши (IL-10). На фигуре 23 мы показываем результаты эксперимента.

Что касается активности IL-10, мы продемонстрировали, что Химера 3 и Химера 5 были активны в отношении функциональности IL-10. Кроме того мы продемонстрировали, что «Химера-5» обладает еще и функциональностью IL-22. Таким образом, фолдикин1022_5 (Химера 5) демонстрирует возможность создания одномолекулярного цитокина с двойной функциональностью. Более того, очевидно, что одна или несколько мутаций в первой половине расщепленного домена IL-22, т.е. T60F, V56I, A27M, T17L, и/или второй половине расщепленного домена, т.е. S314L, ответственны за восстановление активности IL-22.

Что касается контрольных тестов, т.е. основанных на гибридных белках мономеров IL-10 и IL-22, и инвертированном гибриде, т.е. IL-22 и IL-10, связанных через гибкие линкеры, то это привело к почти полной потере функции IL-10, и только частичной активности IL-22, наблюдаемых в гибриде 22-10 («гетеродимер 22-10», см. Фигуру 24). Этот результат подтверждает концепцию фолдикина и важность двух структурированных линкеров, соединяющих домен IL-10 3D/фолдикин с разделенным доменом IL-22 3D /фолдикин, которые соединяют левый и правый 3D-домены свернутого одноцепочечного белка.

Пример 3: Создание фолдикинов на основе семейств цитокинов со спиральными пучками

На структурном уровне для создания фолдикинов можно использовать два основных семейства спиральных пучков цитокинов.

Как указано выше, мы можем классифицировать эти цитокины либо как класс I, либо как класс II, в которые, соответственно, встраиваются линкеры и мостики фолдикина, как описано в данной заявке.

Ниже мы предлагаем фолдикины на основе гомомерных спиральных цитокинов человека I класса. Как будет понятно специалисту, концепция фолдикинов может быть расширена на любой другой интерлейкин, не являющийся человеческим, который обладает структурной совместимостью.

Спиральные цитокины I класса***А) Короткоцепочечные спиральные последовательности и соответствующие гомомерные фолдикины***

Человеческие последовательности IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, IL15, IL21, TSLP и GMCS-F

Мы удалили сигнальный пептид из приведенных ниже последовательностей, но специалисту в данной области будет понятно, что аналогичные конструкции, содержащие сигнальный пептид, также входят в объем изобретения.

>sp|P60568|IL2_HUMAN Интерлейкин-2 (SEQ ID NO: 79)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLO
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

>sp|P08700|IL3_HUMAN Интерлейкин-3 (SEQ ID NO: 80)

RPGLQAPMTQTTPPKTSWVNCNMIDEIITHLKQPPLPLLDNFNNLNGEDQDILMENNLRRENLEAFNRAVKS LQNAS
AIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPINIKDGDWNEFRKLT FYLKTLENAQAQQTTL SLAIF

>sp|P05112|IL4_HUMAN Интерлейкин-4 (SEQ ID NO: 81)

GNFVHGHKCDITLQEI IKTLSLQKTLCTELTVDI FAASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQ
QFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS

>sp|P05113|IL5_HUMAN Интерлейкин-5 (SEQ ID NO: 82)

TEIPTSAVKETLALLSTHRTLLIANETLRI PVPVHKNHQLCTEEI FQGI GTLESQTVQGGTVERL FKNLSLIKKYI
DGQKKKCGEERRRVNQFLDYLQEF LGVMNTEWII ES

>sp|P13232|IL7_HUMAN Интерлейкин-7 (SEQ ID NO: 83)

PVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLEC-
50NSTGDFDLHLLKVS EGTIILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKQLNDL CFLKRLQLQEI KTCWNK
ILMGTKEH

>sp|P15248|IL9_HUMAN Интерлейкин-9 (SEQ ID NO: 84)

QGCPTLAGILDINFLINEC-
50QEDPASKCHCSANVTSCLC LGIPSDNCTRPCFSERLSQMTNTTMQTRYPLIFSRVKKSVEVLKNNKCPYFSC EQP
CNQTTAGNALTFLKSLLEIFQKEEC-50RGMRGKI

>sp|P40933|IL15_HUMAN Интерлейкин-15 (SEQ ID NO: 85)

NSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHP SCKVTAMKCFLELQVI
SLESGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

>sp|Q9HBE4|IL21_HUMAN Интерлейкин-21 (SEQ ID NO: 86)

HKSSSQGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERI INVS IK
KLKRKPPSTNAGRRQKHRLT CPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQEC-50IHQHLSSRTHGSED

>sp|Q969D9|TSLP_HUMAN Тимический стромальный лимфопоэтин (SEQ ID NO: 87)

YDFTNCDFEKIKAAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEFNNTVSCSNRPHCLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAA
LAIWCPGYSETQINATQAMKKRRKRKVT TNKCLEQVSQLOGLWRRFNRPLLKQQ

>sp|P04141|CSF2_HUMAN Гранулоцитарно-макрофагальный

колониестимулирующий фактор (SEQ ID NO: 88)

QPWENVNAIQEARRLLNLSRDTAАЕМNETVEVISEMFDLQЕPTCLQTRLELYKQGLRGS�TKLKGPLTMMASHYKQH
 СРРТРЕТССАТQIITFESFKENLKDFFLLVIFPDCWEPVQE

Для каждого из вышеупомянутых интерлейкинов мы предлагаем методологию создания гомомерных фолдикинов, обычно следующую схеме, показанной на Фигуре 26, как объяснено ниже. Для димеров с «обмениваемыми доменами» стратегия фолдикинов другая, как показано, например, на Фигуре 25.

Предлагаемый класс I гомомерных фолдикинов: подкласс пучков коротких спиралей.

Жирным шрифтом и двойным подчеркиванием мы выделяем последовательность петли, которая была разомкнута в другом мономере цитокина для образования расщепленного домена. Курсивом выделена разделенная молекула/домен, объединенный с N- и C-концами интактного мономера. (X_n) представляют собой соединительные линкеры, созданные для связывания одного домена фолдикина с другим доменом фолдикина. Линкерные последовательности созданы для обеспечения желаемой структурной конформации или представляют собой просто комбинацию Gly и Ser разных длин. Однако выгодно, чтобы сконструированные линкерные последовательности представляли собой «структурированные» линкеры, которые предпочитают конкретную 3D-конформацию, и, следовательно, в выгодных воплощениях изобретения сконструированные линкеры не содержат остатков Gly или Ser или предпочтительно содержат 3 или менее, 2 или менее или 1 или менее остатка Gly или Ser. XX_ и _YY указывают на то, что дополнительные остатки могут быть добавлены к N- и C-концам расщепленного домена в положении удаленной, частично удаленной или просто открытой последовательности петли. Кроме того, до 10 остатков справа или слева, соответственно на новых N- и C-концах могут быть удалены без ущерба для активности, в зависимости от конструкции и структурных требований. Таким образом, XX и YY являются необязательными элементами последовательности, которые могут включать всю часть последовательностей с разомкнутой петлей и не образуют часть последовательностей, идентифицированных соответствующими SEQ ID NO, указанными ниже.

Следует понимать, что проиллюстрированное положение этих линкеров представляет собой воплощение раскрытия; но может быть возможно изменить положение этих линкеров - в частности, положение линкерных мостиков может измениться на 1 - 10 или 1 - 5 аминокислот, например, на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот либо в N-концевом направлении, либо в C-концевом направлении, не предотвращая образования функционального фолдикина. Таким образом, указанное положение этих

линкеров следует считать приблизительным и в каждом случае может быть расширено для включения (или удаления) некоторых окружающих остатков. Например, с каждой стороны положения (X_n) может быть удалено до 10 аминокислот.

Для удобства поиска структурно консервативные спирали в каждом семействе помечены в том порядке, в котором они находятся в исходной последовательности WT (т.е. HA, HB...), а спиральные сегменты — h. Когда спиральный сегмент представляет собой слегка искаженную спираль и, следовательно, некоторые остатки не обозначаются как h в swisspdb, а окружены правильными спиральными сегментами, мы обозначаем их как h-Nres-h, где Nres может быть любым количеством остатков, обозначенных как - . Спиральные сегменты определяются с помощью программного обеспечения swisspdb и могут незначительно различаться по длине в зависимости от программного обеспечения, используемого для их определения, а также от кристаллической структуры.

Фолдикин-2 (Интерлейкин-2) (XX_SEQ ID NO: 89-(X_n)-SEQ ID NO: 90-(X_n)-SEQ ID NO: 91_YY)

Последовательность разомкнута в одном из цитокиновых мономеров QSKNFHLR, SEQ ID NO: 92

```

XX_PRLDISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (Xn) TSSSTKKTQLQLEH
   hhhh-hhhhhhhhhh                hhhhhhhhhhhhhhhhh                hhhhhhhhhhhhhh
          HC                                HD                                HA
LLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A QSKNFHLR P R D L I
hhhhhhhhhhhhhh                hhhhhh                hhh                hhhhhhh--hhhhh                hhhh
                                     HB
SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (Xn) TSSSTKKTQLQLEHLLLDLQM
hhhhhhhhhhhh                hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh                hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
          HC                                HD                                HA
I L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A _ Y Y
hhhhh                hhhhhh                hhhhhhh--hhhhh
                                     HB

```

Фолдикин-4 (Интерлейкин-4) (XX_SEQ ID NO: 93-(X_n)-SEQ ID NO: 94-(X_n)-SEQ ID NO: 95_YY)

Последовательность разомкнута в одном из цитокиновых мономеров, GATA, SEQ ID NO: 96.

```

XX_QQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS (Xn) GNFVHGH
   hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh                hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
          HC                                HD
KCDITLQEI I K T L N S L T E Q K T L C T E L T V T D I F A A S K N T T E K E T F C R A A T V L R Q F Y S H H E K D T R C L GATAQ
hhhhhhhhhhhhhh                hhh                hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh                hhh                hh
          HA                                HB
Q F H R H K Q L I R F L K R L D R N L W G L A G L N S C P V K E A N Q S T L E N F L E R L K T I M R E K Y S K C S S ( X n ) G N F V H G H K C D
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh                hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
          HC                                HD
I T L Q E I I K T L N S L T E Q K T L C T E L T V T D I F A A S K N T T E K E T F C R A A T V L R Q F Y S H H E K D T R C L _ Y Y
hhhhhhhhhhhhhh                hhh                hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh                hhh
          HA                                HB

```

Фолдикин-3 (Интерлейкин-3) (XX_SEQ ID NO: 97-(X_n)-SEQ ID NO: 98-(X_n)-SEQ ID NO: 99_YY)

Последовательность разомкнута в одном из цитокиновых мономеров, KSLQNA, SEQ ID NO: 100.

XX_SAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHP~~IHIKGDWNEFRRLTFYLKTLENAQA~~ (Xn)
 hhhhhhh hh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
 SWVNCNMI~~EII THLKQPPLPLLD FNNLNGEDQDILMENNLRPNLEAFNRAV~~
 hhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhh
 HA HB
KSLQNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHP~~IHIKGDWNEFRRLTFYLKTLENAQA~~ (Xn)
 hhhhhhh hh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
 SWVNCNMI~~EII THLKQPPLPLLD FNNLNGEDQDILMENNLRPNLEAFNRAV~~-YY
 hhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhh
 HA HB

Фолдикин-5 (Интерлейкин-5; димер с обменом) (XX_SEQ ID NO: 101-(NtCt)-SEQ ID NO: 102_YY)

XX_TEIPTSALVKETLALLSTHRTLLIANETLRIPVPVHKNHQ~~LCTEEIFQIGTLESQTVQGGTVERL~~FK
 hhhhhhhhhhh hhhh hhhhhhhhh hhhhh
 HA HB
 NLSLIK~~KYIDGQKKCGEERRRVNQFLDYLOEFLGVMNTEWII~~ES (NtCt)
 hhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
 TEIPTSALVKETLALLSTHRTLLIANETLRIPVPVHKNHQ~~LCTEEIFQIGTLESQTVQGGTVERL~~FKNL
 hhhhhhhhhhh hhhh hhh hhhhhhhhh hhhhhhh
 HA HB HC
 SLIK~~KYIDGQKKCGEERRRVNQFLDYLOEFLGVMNTEWII~~ES_YY
 hhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HD

Фолдикин-7 (Интерлейкин-7) (XX_SEQ ID NO: 103-(Xn)-SEQ ID NO: 104-(Xn)-SEQ ID NO: 105_YY)

Последовательность разомкнута в одном из цитокиновых мономеров, KMNSTG, SEQ ID NO: 106.

XX_DFDLHLLK~~VSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALG~~EAQPTKSLEENKSLKEQK~~KLNDLCFLKRL~~LQEIKTC
 hhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
 WNKILMG~~TKEH~~ (Xn) PVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSI~~DQLLD~~SMKEIGSNCLNNEFNFFKR~~HIC~~DANKE
 hhhh hhh--hhhhhhhh hhh
 HA
 GMFLFRAARKLRQFL~~KMNSTG~~DFDLHLLK~~VSEGT TILLNCTGQVKGRKPAALG~~EAQPTKSLEENKSLKEQ
 hhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh
 HB HC
 KKLNDLCFLKRL~~LQEIKTC~~WNKILMG~~TKEH~~ (Xn) PVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSI~~DQLLD~~SMKEIGSN
 hhhhhhhhhhhhhhh hhh--hhhhhhhh
 HD HA
 CLNNEFNFFKR~~HIC~~DANKEGMFLFRAARKLRQFL_YY
 hhhh hhhhhhhhh
 HB

Фолдикин-9 (Интерлейкин-9) (XX_SEQ ID NO: 107-(Xn)-SEQ ID NO: 108-(Xn)-SEQ ID NO: 109_YY)

Последовательность разомкнута в одном из цитокиновых мономеров, RYP.

XX_LIFSRV~~KKSVEVLKNNKCPYFSCEQPCNQTTAGNAL~~TFLKSLLEIFQKEKMRGMRGKI (Xn) QGCPTLAG
 hhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh hhh
 HC HD
 ILDINFLINKMQEDPASKCHCSANVTSC~~LCLGIPSDNCTR~~PCFSE~~RLS~~QMTNT~~TMQT~~**RYP**LIFSRV~~KKS~~V
 hhhhhhhhhhh hhhhh hhhh hhhhhhhhh
 HA HB HC

EVLKNNKCPYFSC EQPCNQTTAGNALTFLKSLEIFQEKMRGMRGKI (Xn) QGCPTLAGILDINFLINKMQ
 hhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HD HA
 EDPASKCHCSANVTSC LCLGIPSDNCTRPCF SERLSQMTNTT MQT_YY
 hhhhh hhhh
 HB

Фолдикин-15 (Интерлейкин-15) (XX_SEQ ID NO: 110-(Xn)-SEQ ID NO: 111-(Xn)-SEQ ID NO: 112_YY)

Последовательность разомкнута в одном из цитокиновых мономеров, SGD.

XX_ASIHDTVENLII LANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (Xn)
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
TEANWVNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVIS
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HA HB
LESGDASIHDTVENLII LANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (Xn) NSHFL
 hh hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
TEANWVNVI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLE_YY
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HA HB

Фолдикин-21 (Интерлейкин-21) (XX_SEQ ID NO: 113-(Xn)-SEQ ID NO: 114-(Xn)-SEQ ID NO: 115_YY)

Последовательность разомкнута в одном из цитокиновых мономеров, NTG.

XX_NERIINVS IKKLRKPPSTNAGRRQKHRLT CPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLS SRTHGS
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
ED (Xn) HKSSSQGQDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTG
 hhhhhhhhhhh---hhhhh hhhhhhhhhhh
 HA HB
NNERIINVS IKKLRKPPSTNAGRRQKHRLT CPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLS SRTHGSE
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
D (Xn) HKSSSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSA_YY
 hhhhhhhhhhh---hhhhh hhhhhhhhhhh
 HC HD

Фолдикин-TSL (тимический стромальный лимфопоэтин) (XX_SEQ ID NO: 116-(Xn)-SEQ ID NO: 117-(Xn)-SEQ ID NO: 118_YY)

Последовательность разомкнута в одном из цитокиновых мономеров, SLAK, SEQ ID NO: 119)

XX_EMFAMKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKRRRKRKVT TNKCLEQVSQ LQGLWRRFNRPLLKQQ (Xn)
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
NCDFEIKAAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEFNNTVSCSNRPHCLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAM
 Hhhhhhhhhhh---hhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh hhhh
 HA HB
KTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKRRRKRKVT TNKCLEQVSQ LQGLWRRFNR (Xn) NCDFFE
 hhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh hh
 HC HD
KIKAAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEFNNTVSCSNRPHCLTEIQSLTFNPTAGCA_YY
 hhhhhhhhh---hhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HA HB

Фолдикин-GMCSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) (XX_SEQ ID NO: 120-(Xn)-SEQ ID NO: 121-(Xn)-SEQ ID NO: 122_YY)

Последовательность разомкнута в одном из цитокиновых мономеров, RGS.

```

XX_LTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQII TFESFKENLKDPELLVDPDCW (Xn) QPWEHVNA
hh      hhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhh
      HA                        HB
IQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEP TCLQTRLELYKQGLRGS LTKLKGPLTMMASHYKQHC
hhhhhhhhhh      hhhh      hhhhhhhhhhh      hh      hhhhhhhhhhhhhhh
      HA                        HB                        HC
PPTPETSCATQII TFESFKENLKDPELLVDPDCW (Xn) QPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNET
      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhh      hhhh
                        HD                        HA
VEVISEMFDLQEP TCLQTRLELYKQGL_YY
      hhhhhhhhhhh
                        HB

```

В) Длинноцепочечные спиральные последовательности и соответствующие гомомерные фолдикины

Человеческие последовательности IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTF1, LIF, OSM и CSF3.

Опять же, мы удалили сигнальный пептид из каждой конструкции, но в воплощениях сигнальный пептид, конечно, можно сохранить.

>sp|P05231|IL6_HUMAN Интерлейкин-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IL6 PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 123)

```

PVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISA LRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGC FQSG
FNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNR FESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQ
NQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM

```

>tr|A8K3F7|A8K3F7_HUMAN Интерлейкин 11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IL11 PE=2 SV=1 (SEQ ID NO: 124)

```

PGPPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSL LADTRQLAAQLRDKFPADGDHNLDSLPTLAMSAGALGALQLPGV LTRLR
ADLLSYLRHVQWLR RAGGSSLKTLPELGT LQARLDRLRLRLQLLMSRLALPQP PPDPPAPPLAPPSSAWGG IRAAH
AILGGLHLTLDWAVRGLLLLKTRL

```

>sp|P29459|IL12A_HUMAN Субъединица альфа интерлейкина-12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IL12A PE=1 SV=2 (SEQ ID NO: 125)

```

RNLFPVATPDPMFPCLHHSQNL LRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNLMAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

```

>sp|Q9NPF7|IL23A_HUMAN Субъединица альфа интерлейкина-23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IL23A PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 126)

```

RAVPGGSSPAWTQCQQLSOKLCTLAWSAHPVGHMDLEEGDEETTNDVPHIQCGDGC DPQGLRDNSQFCLQRIHQGL
IFYEKLLGSDIFTGEP SLLPDSPVGQLHASLLGLS QLLQPEGHHWETQQI PSLSPSQPWQRLLLLRFKILRS LQAFVA
VAARVFAHGAATLSP

```

>sp|Q8NEV9|IL27A_HUMAN Субъединица альфа интерлейкина-27 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IL27 PE=1 SV=2 (SEQ ID NO: 127)

FPRPPGRPQLSLQELRREFTVSLHLARKLLSEVRGQAHRAESHLPGVNLYLLPLGELPDVSLTFQAWRRLSDPER
LCFISTTLQPFHALLGGLGTQGRWTNMMERMQLWAMRLDLRDLQRHLRFQVLAAGFNLPPEEEEEEEEEEEEEERKGLLP
GALGSALQGPQVSWPQLLSTYRLLHSLELVLSRAVRELLLLSKAGHSVWPLGFPPTLSQPQ

**>sp|Q6EBC2|IL31_HUMAN Interleukin-31 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IL31
PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 128)**

SHTLPVRLLRPSDDVQKIVEELQSLSKMMLLKDVVEEKGVLSQNYTLPCLSPDAQPPNNIHS PAIRAYLKTIRQLDN
KSVIDEIIEHLDKLIFQDAPETNISVPTDTHECKRFILTISSQQFSECMDLALKSLTSGAQQATT

**>sp|Q9UBD9|CLCF1_HUMAN Кардиотрофиноподобный цитокиновый фактор
1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLCF1 PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 129)**

LNRTGDPGPGPSIQKTYDLTRYLEHQLRSLAGTYLNYLGPPFNEPDEFNPPRLGAETLPRATVDLEVWRS LNDKLRLLT
QNYEAYSHLLCYLRGLNRQAATAELRRSLAHFCTSLQGLLGS IAGVMAALGYPLPQPLPGTEPTWTPGPAHSDFLQK
MDDFWLLKELQTLWRSKDFNRLKKKMPPAAAVTLHLGAHGF

**>sp|P13725|ONCM_HUMAN Онкостатин-М OS=Homo sapiens OX=9606
GN=OSM PE=1 SV=2 (SEQ ID NO: 130)**

MAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLLDPYIRIQGLDVPKLRHECHRRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNA
TLGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKQLQMARPNILGLRNNIYCMAQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTP
TPASDAFQRKLEGRFLHGYHRFMHSVGRVFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGVRRTPRSRKGRKRLMTRGQLPR

**>sp|Q16619|CTF1_HUMAN Кардиотрофин-1 OS=Homo sapiens OX=9606
GN=CTF1 PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 131)**

MSRREGSLEDPQTDSSVSLPHLEAKIRQTHSLAHLITKYAEQQLQEQYVQLQGDPFGLPSFSPRRLPVAGLSAPAPS
HAGLPVHERLRLDAAALAALPPLLDVAVCRRQAELNPRAPRLLRRLEDAARQARALGAAVEALLAALGAANRGPRAEP
PAATASAASATGVFPAKVLGLRVCGLYREWLSRTEGDLGQLLPGGSA

**>sp|P26441|CNTF_HUMAN Цилиарный нейротрофический фактор OS=Homo
sapiens OX=9606 GN=CNTF PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 132)**

MAFTEHSPLTPHRRDLCSRSIWLARKIRSDLTALTESYVKHQGLNKNINLDSADGMPVASTDQWSELTEAERLQENL
QAYRTFHVLLARLLEDQQVHFTPTGDFHQAIHTLLLQVAAFAYQIEELMILLEYKIPRNEADGMPINVGDGGLFEK
KLWGLKVLQELSQWTVRSIHDLRFISSHQTGIPARGSHYIANNKKM

**>sp|P15018|LIF_HUMAN Фактор ингибирования лейкоза OS=Homo sapiens
OX=9606 GN=LIF PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 133)**

SPLPITPVNATCAIRHPCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFIL_YYTAQGEFPFNNLDKLCGPNVTDFFPPFHANGTE
KAKLVELYRIVVYLGTS LGNITRDQKILNPSALSLSKLNATADILRGLLSNVLCRLCSKYHVGHVDVITYGPDTS GK
DVFQKKKLGCLLQKQYKQIIAVLAQAF

**>sp|P09919|CSF3_HUMAN Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSF3 PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 134)**

TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVSECATYKLCHPPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGC
LSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVAADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAPAFASAFQRRAGGV
LVASHLQSFLEVS YRVLRHLAQF

Предлагаемый класс I гомомерных фолдикинов: подкласс пучков длинных спиралей.

Фолдикины согласно этим воплощениям изобретения синтезируют по схеме, изображенной на Фигуре 26.

Жирным шрифтом с двойным подчеркиванием выделена последовательность петли, которая была разомкнута в другом мономере цитокина для образования расщепленного домена. Курсивом выделена молекула расщепленного домена, объединенная с N- и C-концами интактного мономера. (Xn) представляют собой соединительные линкеры, созданные для связывания одного домена фолдикина с другим доменом фолдикина. Линкерные последовательности созданы для обеспечения желаемой структурной конформации или представляют собой просто комбинацию Gly и Ser разных длин. Однако выгодно, чтобы сконструированные линкерные последовательности представляли собой «структурированные» линкеры, которые предпочитают конкретную 3D-конформацию, и, следовательно, в выгодных воплощениях изобретения сконструированные линкеры не содержат остатков Gly или Ser или предпочтительно содержат 3 или менее, 2 или менее или 1 или менее остатка Gly или Ser. XX_ и _YY указывают на то, что дополнительные остатки могут быть добавлены к N- и C-концам расщепленного домена в положении удаленной, частично удаленной или просто открытой последовательности петли. Кроме того, до 10 остатков справа или слева, соответственно на N- и C-концах могут быть удалены без ущерба для активности, в зависимости от конструкции и структурных требований. Таким образом, XX и YY являются необязательными элементами последовательности, которые могут включать всю часть последовательностей с разомкнутой петлей и не образуют часть последовательностей, идентифицированных соответствующими SEQ ID NO, указанными ниже.

Следует понимать, что проиллюстрированное положение этих линкеров представляет собой воплощение раскрытия; но возможно изменить положение этих линкеров - в частности, положение линкерных мостиков может измениться на 1 - 10 или 1 - 5 аминокислот, например, на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот либо в N-концевом направлении, либо в C-концевом направлении, не предотвращая образования функционального фолдикина. Таким образом, указанное положение этих линкеров следует считать приблизительным и в каждом случае может быть расширено для включения (или удаления) некоторых окружающих остатков. Например, с каждой стороны положения (Xn) может быть удалено до 10 аминокислот.

Для простоты поиска структурно консервативные спирали в семействе помечены в том порядке, в котором они находятся в исходной последовательности WT (т.е. HA, HB...), а спиральные сегменты — буквой h. Когда спиральный сегмент представляет собой слегка искаженную спираль и, следовательно, некоторые остатки не обозначаются

MFSA

>sp|Q9N_YY1|IL20_HUMAN Интерлейкин-20 OS=Homo sapiens OX=9606

GN=IL20 PE=1 SV=2 (SEQ ID NO: 183)

KTLNLGSCVIATNLQEIIRNGFSEIRGSVQAKDGNIDIRILRRTESLQDTKPANRCCLLRHLLRLYLDRVFKNYQTPD
HYTLRKISSLANSLFTIKKDLRLCHAHTCHCGEEAMKKYSQILSHFEKLEPQAAVVKALGELDILLQWMEETE

>sp|Q9GZX6|IL22_HUMAN Интерлейкин-22 OS=Homo sapiens OX=9606

GN=IL22 PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 184)

APISSHCRLDKSNFQOPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDR
FQPYMQEVVFPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLDKTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI

>sp|Q9NPH9|IL26_HUMAN Интерлейкин-26 OS=Homo sapiens OX=9606

GN=IL26 PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 185)

HKQSSFTKSCYPRGTLTSAVDALYIKAAWLKATIPEDRIKNIIRLLKKTKKQFMKNCQFQEQLLSFFMEDVFGQLQL
QGCKKIRFVEDFHSRLRQKLSHCISCASSAREMKSITRMKRIFYRIGNKGIYKAI SELDILLSWIKKLESSQ

>sp|Q8IZJ0|IFNL2_HUMAN Интерферон лямбда-2 OS=Homo sapiens OX=9606

GN=IFNL2 PE=2 SV=1 (SEQ ID NO: 186)

RGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDCRCHSRLFPRTWDLRQLQVRERPMALAEALATLKVLEATADT
DPALVDVLDQPLHTLHHILSQFRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLYRLQEAPKKESPGCLEASVTFNLFRLLTRDLNC
VASGDLCV

>sp|Q8IZI9|IFNL3_HUMAN Интерферон лямбда-3 OS=Homo sapiens OX=9606

GN=IFNL3 PE=1 SV=2 (SEQ ID NO: 187)

VPVARLRGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDKCRSRLFPRTWDLRQLQVRERPVALEAEL
ALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKKESPGCLEASVT
FNLFRLLTRDLNLCVASGDLCV

>sp|Q8IU54|IFNL1_HUMAN Интерферон лямбда-1 OS=Homo sapiens OX=9606

GN=IFNL1 PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 188)

GPVPTSKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDLRLLQVRERPVALEAELA
LTLKVLEAAAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRPRGRLHHWLHRLQEAPKKESAGCLEASVTFNL
FRLLTRDLKYVADGNLCLRTSTHPEST

>sp|P01562|IFNA1_HUMAN Интерферон альфа-1/13 OS=Homo sapiens OX=9606

GN=IFNA1 PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 189)

DLPETHSLDNRRITLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPAI SVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWD
EDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSI LAVKKYFRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSL
TNLQERLRKE

>sp|P01574|IFNB_HUMAN Интерферон бета OS=Homo sapiens OX=9606

GN=IFNB1 PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 190)

MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI FAIFRQDSSST
GWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSHLKR_YYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRN
FYFINRLTGyLRN

>sp|P05000|IFNW1_HUMAN Интерферон омега-1 OS=Homo sapiens OX=9606

GN=IFNW1 PE=1 SV=2 (SEQ ID NO: 191)

LGCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRI SPFLCLKDRRDFRFPQEMVKGSQQLQKAHVMSVLHEMLQQIFSLFHTERSA
 AWNMTLDDQLHTGLHQQLQHLETCLLQVVGEGESAGAI SSPALTLRRYFQGIRVYLLKEKKYSDCAWEVVRMEIMKSL
 FLSTNMQERLRSKDRDLGSS

>sp|Q86WN2|IFNE_HUMAN Интерферон эpsilon OS=Homo sapiens OX=9606

GN=IFNE PE=2 SV=1 (SEQ ID NO: 192)

LDLKLII FQQRQVNQESLKLNLKLTLSIQQLPHRKNFLLPQKSLSPQQYQKGHTLAILHEMLQQIFSLFRANISL
 DGWEENHTEKFLIQHLHQOLEYLEALMGLEAEKLSGTLGSDNLRQLQVKMYFRRIHDYLENQDYSTCAWAIQVEISRC
 LFFVFSLTEKLSKQGRPLNDMKQELTTEFRSPR

>sp|Q9P0W0|IFNK_HUMAN Интерферон kappa OS=Homo sapiens OX=9606

GN=IFNK PE=1 SV=2 (SEQ ID NO: 193)

LDCNLLNVHLRRVTWQNLRLHLSMSNSFPVECLRENI AFELPQEFLOYTQPMKRDIKKAIFYEMSLQAFNIFSQHTFK
 YWKERHLKQIQIGLDQQAAYLNQCLEEDKNENEDMKEMKENEMKPSARPQLSSLELRRYFHRIDNFLKEKKYSDC
 AWEIVRVEIRRCL_YYFYKFTALFRRK

>sp|P01579|IFNG_HUMAN Интерферон gamma OS=Homo sapiens OX=9606

GN=IFNG PE=1 SV=1 (SEQ ID NO: 194)

QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDM
 NVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAGTGRKRKRSQMLFRGRRASQ

Предлагаемый гомомерный фолдикин класса II

Гомодимерные фолдикины цитокинов класса II соответствующим образом собираются по схеме, представленной на Фигуре 27. Курсивом выделен расщепленный домен/молекула, объединенная с N- и C-концами интактного мономера. (X_n) являются соединительными линкерами.

В белках с обмениваемыми доменами, таких как IL-10 и IFN γ , X_n соответствует остаткам, выделенным жирным шрифтом и дважды подчеркнутым, которые представляют собой естественную последовательность, эквивалентную разработанным петлям S_n, введенным в мономерные цитокины. Фолдикины с замененными доменами цитокинов класса II собираются по схеме, представленной на Фигуре 28.

В цитокинах с необмениваемыми доменами (X_n) представляют собой соединяющие линкеры, созданные для связывания одного домена фолдикина с другим доменом фолдикина. Линкерные последовательности созданы для обеспечения желаемой структурной конформации или представляют собой просто комбинацию Gly и Ser разных длин. Однако более выгодно, чтобы сконструированные линкерные последовательности представляли собой «структурированные» линкеры, которые предпочитают конкретную 3D-конформацию, и, следовательно, в полезных воплощениях раскрытия сконструированные линкеры не содержат остатков Gly или Ser или предпочтительно содержат 5 или менее, предпочтительно 3 или менее, 2 или менее или 1 или менее остатка

Gly или Ser. XX_ и YY_ указывают, что дополнительные остатки могут быть добавлены к N- и C-концам или, альтернативно, до 10 остатков справа или слева, соответственно, от положений XX_ и YY_ на новых N- и C-концах могут быть удалены без влияния на активность, в зависимости от дизайна и структурных требований. Таким образом, XX и YY являются необязательными элементами последовательности и не образуют часть последовательностей, идентифицированных соответствующими SEQ ID NO, указанными ниже.

Следует понимать, что проиллюстрированное положение этих линкеров представляет собой воплощение раскрытия; но может быть возможно изменить положение этих линкеров - в частности, положение линкерных мостиков может измениться на 1-10 или 1-5 аминокислот, например, на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в N-концевом направлении, C-концевом направлении или в обоих, не предотвращая образования функционального фолдикина. Таким образом, указанное положение этих линкеров следует считать приблизительным и в каждом случае может быть расширено для включения (или удаления) некоторых окружающих остатков. Например, с каждой стороны положения (X_n) может быть удалено до 10 аминокислот.

Для удобства поиска структурно консервативные спирали в семействе помечены в том последовательном порядке, в котором они находятся в исходной последовательности WT (т.е. HA, HB...), а спиральные сегменты помечены h. Если спиральный сегмент представляет собой слегка искаженную спираль и поэтому некоторые остатки не обозначаются как h в swisspdb, а окружены правильными спиральными сегментами, мы обозначаем сегмент как h-N_{res}-h, где N_{res} может обозначать любое количество остатков, обозначенных как -. Спиральные сегменты определяются с помощью программного обеспечения swisspdb и могут незначительно различаться по длине в зависимости от программного обеспечения, используемого для их определения, а также от кристаллической структуры. (NtCt) линкер, предназначенный для соединения N- и C-концов одного мономера с другим.

Фолдикин-10 (IL10_HUMAN Интерлейкин-10) (XX_SEQ ID NO: 11-(NtCt)-SEQ ID NO: 12-YY)

Ни одна петля не удаляется, поскольку это природный цитокин с обмениваемым доменом. Прямоугольники с жирным шрифтом и дважды подчеркнутым шрифтом соответствуют линкерным последовательностям, которые можно заменить на межспиральные линкеры мономерных цитокинов (как указано ниже) с образованием фолдикинов. Таким образом, (X_n) в последовательностях, приведенных ниже, может представлять собой природную последовательность, указанную ниже, или может

HA HB
 SDRFQPYMQEVVFLARLSNRL (Xn) HIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI (NtCt)
 hhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhhhh
 HC HD HE HF
 APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLFNTLEE
 hhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HA HB
 VLFPOSDRFQPYMQEVVFLARLSNRL (Xn) HIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI-YY
 hhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhhhh
 HC HD HE HF

Фолдикин-26 (Интерлейкин-26 ЧЕЛОВЕКА) (XX_SEQ ID NO: 210-(Xn)-SEQ ID NO: 211-(NtCt)-SEQ ID NO: 212-(Xn)-SEQ ID NO: 213_YY)

(удалена петля SCASSARE; SEQ ID NO: 214)

XX_HKQSSFTKSCYPRGTLTSAVDALYIKAAWLKATIPEDRIKNI RLLKKTCKKQFMKNCQFQEQLLSFFM
 hhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhhhh
 HA HB
 EDVFGQLQLQGCKKIRFVEDFHSLRQKLSHCI (Xn) MKSITRMKRIFYRIGNKGIYKAI SELDILLSWIKKL
 hhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhh
 HC HD HE HF
 LESSQ (NtCt) HKQSSFTKSCYPRGTLTSAVDALYIKAAWLKATIPEDRIKNI RLLKKTCKKQFMKNCQF
 hhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhh hhh
 HA
 QEQLLSFFMEDVFGQLQLQGCKKIRFVEDFHSLRQKLSHCI (Xn) MKSITRMKRIFYRIGNKGIYKAI SELD
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhh hhhhhhh h
 HB HC HD HE
 ILLSWIKKLESSQ_YY
 hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HF

Фолдикин-L2 (Интерферон лямбда-2 ЧЕЛОВЕКА) (XX_SEQ ID NO: 215-(Xn)-SEQ ID NO: 216-(NtCt)-SEQ ID NO: 217-(Xn)-SEQ ID NO: 218_YY)

(удалена петля IQPQPTAGPRTRG; SEQ ID NO: 219)

XX_RGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDCRCHSRLFPRTWDLRQLQVRERPMALAEALATL
 hhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HA HB
 KVLEATADTDPALVDVLDQPLHTLHHILSQFRAC (Xn) RLHHLWYRLQEAPKKEPGCLEASVTFNLFRLLTR
 hhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD HE HF
 DLNCVASGDLCV (NtCt) RGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDCRCHSRLFPRTWDLRQLQ
 hhhhh hhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 HA
 VRERPMALAEALATLKVLEATADTDPALVDVLDQPLHTLHHILSQFRAC (Xn) RLHHLWYRLQEAPKKEPG
 hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh hh
 HB HC HD
 CLEASVTFNLFRLLTRDLNCVASGDLCV_YY
 hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 HE HF

Фолдикин-L3 (Интерферон лямбда-3 ЧЕЛОВЕКА) (XX_SEQ ID NO: 220-(Xn)-SEQ ID NO: 221-(NtCt)-SEQ ID NO: 222-(Xn)-SEQ ID NO: 223_YY)

(удалена петля IQPQPTAGPRTRGR; SEQ ID NO: 224)

XX_RGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDCRCHSRLFPRTWDLRQLQVRERPVALEALATL
 hhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
 HA HB
 KVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRAC (Xn) RLHHLWYRLQEAPKKEPGCLEASVTFNLFRLLTR
 hhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD HE-HF
 DLNCVASGDLCV (NtCt) RGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDCRCHSRLFPRTWDLRQLQ
 hhhhh hhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh

Фолдикин-IFNB (интерферон бета ЧЕЛОВЕКА) (XX_SEQ ID NO: 240-(Xn)-SEQ ID NO: 241-(NtCt)-SEQ ID NO: 242-(Xn)-SEQ ID NO: 243_YY)

(удалена петля KEDFTRGK; SEQ ID NO: 244)

XX_MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFA
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhh hhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
HA HB
IFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLE (Xn) LMSSLHLKRYYGRIILHYLKAKEYSHCAWTIVRVE
hh hh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhh
HC HD
ILRNFYFINRLTGYLRLN (NtCt) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQL
hhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhh hhhh
HE-HF HA
QQFQKEDAALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLE (Xn) LMSSLHLKRYYG
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhh
HB HC
RILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRLN_YY
hhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
HD HE-HF

Фолдикин-IFNW1 (Интерферон омега-1 ЧЕЛОВЕКА) (XX_SEQ ID NO: 245-(Xn)-SEQ ID NO: 246-(NtCt)-SEQ ID NO: 247-(Xn)-SEQ ID NO: 248_YY)

(удалена петля LLQVVGEGESAGAIS; SEQ ID NO: 249)

XX_LGCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRI SPFLCLKDRDRFRFPQEMVKGSQLQKAHVMSVLHEMLQQIFS
hhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
HA HB
LFHTERSSAAWNMTLLDQLHTGLHQQLQHLETC (Xn) SPALTLRRYFQGI RYVLKEKKYSDCAWEVVRMEIM
hhhhh hhhhhh---hhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
HC HD HE-HF
KSFLFLSTNMQ (NtCt) CDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRI SPFLCLKDRDRFRFP
hhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
HA
QEMVKGSQLQKAHVMSVLHEMLQQIFS L FHTERSSAAWNMTLLDQLHTGLHQQLQHLETC (Xn) SPALTLRR
hhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhh hhhhhh---hhh hhhh
HB HC
YFQGI RYVLKEKKYSDCAWEVVRMEIMKSFLFLSTNMQ_YY
hhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
HD HE-HF

Фолдикин-IFNE (интерферон эпсилон ЧЕЛОВЕКА) (XX_SEQ ID NO: 250-(Xn)-SEQ ID NO: 251-(NtCt)-SEQ ID NO: 252-(Xn)-SEQ ID NO: 253_YY)

(удалена петля GLEAEKLSGTLG; SEQ ID NO: 254)

XX_LDLKLIIFQQRQVNQESLKLLNKLQTL SIQQCLPHRKNFLLPQKSLSPQQYQKGHTLAILHEMLQQIF
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
SLFRANISLDGWEENHTEKFLIQLHQQLEYLEALM (Xn) SDNLRLQVKMYFRRIHDYLENQDYSTCAWAIVQ
hhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhh
VEISRCLFFVFLTEKLSKQGRPLNDMQELTTEFRSPR (NtCt) LDLKLIIFQQRQVNQESLKLLNKLQ
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
TLSIQQCLPHRKNFLLPQKSLSPQQYQKGHTLAILHEMLQQIFS LFRANISLDGWEENHTEKFLIQLHQQ
Hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhh
LEYLEALM (Xn) SDNLRLQVKMYFRRIHDYLENQDYSTCAWAIVQVEISRCLFFVFLTEKLSKQGRPLNDM
hhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhh
QELTTEFRSPR_YY
hhhhhhh

Фолдикин-IFNK (Интерферон каппа ЧЕЛОВЕКА) (XX_SEQ ID NO: 255-(Xn)-SEQ ID NO: 256-(NtCt)-SEQ ID NO: 257-(Xn)-SEQ ID NO: 258_YY)

(удалена петля EEDKNENEDMKEMKENEMKPSEAR; SEQ ID NO: 259)

XX_LDCNLLNVHLRRVTWQNLRLHSSMSNSFPVECLRENI AFELPQEF LQYTQPMKRDIKKA FYEMSLQAF
 hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 HA HB
 NIFSQHTFKYWKERHLKQIQIGLDQQA EYLNQCL (Xn) VPQLSSLELRRYFHRIDNFLKEKKYSDCAWEIVR
 hhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhh
 HC HD
 VEIRRCL YYFYKFTALFRRK (NtCt) LDCNLLNVHLRRVTWQNLRLHSSMSNSFPVECLRENI AFELPQEF
 hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhh
 HE-HF HA
 FLQYTQPMKRDIKKA FYEMSLQAFNIFSQHTFKYWKERHLKQIQIGLDQQA EYLNQCL (Xn) VPQLSSLELR
 hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhh
 HB HC
 RYFHRIDNFLKEKKYSDCAWEIVRVEIRRCL YYFYKFTALFRRK YY
 hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 HD HE-HF

**Фолдикин-IFNG (интерферон гамма ЧЕЛОВЕКА) (XX-SEQ ID NO: 14-(NtCt)-
SEQ ID NO: 15-YY)**

**НИКАКАЯ ПЕТЛЯ НЕ УДАЛЕНА, ПОСКОЛЬКУ ЭТО ЕСТЕСТВЕННЫЙ
ОБМЕНИВАЕМЫЙ ДОМЕН II**

**XX_QDPYVKEAENLK KYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKL
FKNFKDDQSIQK**

XX_QDPYVKEAENLK KYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKL FKNFKDDQSIQK
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hh hhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hh
 HA HB
 SVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPMLF (NtCt)
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhh hhhhhhhhh hhhhhhh
 HC HD HE HF
 MQDPYVKEAENLK KYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKL FKNFKDD
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 HA HB
 QSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRRRSQ
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhh hhhhhhhhh--hhhhhhhh
 HC HD HE HF
 MLFRGRRASQ YY

**Фолдикин-IFNG (интерферон гамма ЧЕЛОВЕКА) (ORKIFNg-002) (SEQ ID
NO:18)**

GSQDPYVKEAENLK KYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKL FKNFKDDQSIQK
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hh hhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hh
 HA HB
 SVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPHPGQLWA
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhh hhhhhhhhh hhhhhhh
 HC HD HE HF
 YVKEAENLK KYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKL FKNFKDDQSIQKSVETI
 hhhhhhhhhhhhhhhhh hh hhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhh
 HA HB HC
 KEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA
 hhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhh hhhhhhhhh hhhhhhhhh
 HC HD HE HF

Гетеродимерные фолдикины класса I и класса II

Одномолекулярные гетеродимерные фолдикины могут быть образованы между цитокином класса I и цитокином класса II по схемам, указанным на фигурах 6А и 6В.

А) Цитокины класса I, которые могут быть объединены с цитокинами класса II

В) Цитокины класса I, которые могут быть объединены с цитокинами класса II с образованием гетеродимерных фолдикинов в соответствии с различными воплощениями схемы построения на Фигуре 6В, включают цитокины с короткоспиральным пучком, такие как IL2, IL3, IL4, IL7, IL9, IL15, IL21 и GMCS-F; и цитокины с длинноспиральным пучком, такие как IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTGF, LIF, OSM и CSF3.

Цитокины класса II, которые могут быть объединены с цитокинами класса I с образованием гетеродимерных фолдикинов в соответствии с различными воплощениями схемы построения на Фигуре 6В, включают IL10-подобный класс белков IL19, IL20, IL22, IL24 и IL26; IL28A, IL28B и IL29 (IFN λ); интерферон I типа (IFN α (IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17 и IFNA21); IFN ω (IFNW1); IFN ϵ (IFNE); IFN κ (IFNK); IFN β (IFNB1)) и IFN γ .

Могут быть использованы две разные схемы в зависимости от того, получают ли мономер цитокина с расщепленным доменом из цитокина класса I или цитокина класса II.

Гетеродимеры фолдикинов класса I/класса II

В первом примере фолдикин класса I расщепляется, и между расщепленными N- и C-концевыми частями цитокина класса I вставляется непрерывный цитокин класса II. Согласно этим воплощениям цитокин класса I и класса II инвертирован по сравнению со структурой цитокинов класса I и класса II дикого типа, соответственно, потому что C-концевая часть цитокина дикого типа образует N-концевую часть соответствующей части/домена фолдикина, и N-концевая часть цитокина дикого типа образует C-концевую часть соответствующей части/домена фолдикина.

Фолдикины согласно этому аспекту и различным воплощениям раскрытия образуются путем размыкания линкерной области/петли в цитокине класса I для создания новых N- и C-концов; например, между второй и третьей α -спиралями. Аналогично, линкерная область/петля в цитокине класса II размыкается для создания новых N- и C-концов для объединения с исходными N- и C-концами цитокина класса I. Затем линкеры (X_n) используются для соединения исходного C-конца цитокина класса I с новым N-концом цитокина класса II, а исходного N-конца цитокина класса I с новым C-концом цитокина II класса. Петля, которая размыкается в цитокине класса I, показана жирным шрифтом в последовательности ниже.

В качестве примера ниже показан гетеродимерный полипептид IL-2/IL-22 согласно этому воплощению (SEQ ID NO: 198). В этой последовательности курсивом показана расщепленная полипептидная последовательность IL-2, а подчеркнутым шрифтом —

«непрерывная» (инвертированная) последовательность IL-22. Жирным шрифтом выделена петля IL-2, которая будет разомкнута для создания новых N- и С-концов нового белка фолдикина. Точное положение размыкания и сохраняемые остатки могут варьировать и включать любое количество выделенных жирным шрифтом остатков, как описано ранее.

IL-2/IL-22 (фолдикин2-22_6B; XX_SEQ ID NO: 263-(Xn)-SEQ ID NO: 264-(NtCt)-SEQ ID NO: 265-(Xn)-SEQ ID NO: 266_YY)

XX-FHLRPRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII***STLT (Xn) LHIQRNVQKLKDTVKK***
 hhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD HD
LGESGEIKAIGELDLFLFMSLRNACI (NtCt) CRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVR***LIGEKLFHGVSMSE***
 hhhhhhh hhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhh
 HE HF HA
RCYLMQVLFNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRL (Xn) TSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ***MILNGINNYKNP***
 hhhhhhhhhhhhhhhh hhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 HB HC HA
KLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLA***OSKN-YY***
 hhhhhh hhh hhhhhhh---hhhhh
 HB

Во втором примере фолдикин класса II расщепляется, и непрерывный цитокин класса I вставляется между разделенными N- и С-концевыми частями цитокина класса II. Согласно этим воплощениям ни цитокин класса I, ни цитокин класса II не инвертируется, так что порядок α -спиралей соответствует порядку соответствующих цитокинов дикого типа (за исключением расщепленного домена мономера).

Фолдикины согласно этому аспекту и различным воплощениям раскрытия образуются путем размыкания линкерной области/петли в цитокине класса II для создания новых N- и С-концов; например, между третьей и четвертой α -спиралями. Затем линкеры (Xn) используются для соединения новых С- и N-концов расщепленных последовательностей цитокинов класса II с исходными N- и С-концами, соответственно, непрерывного домена цитокинов класса I.

В качестве примера ниже показан гетеродимерный полипептид IL-22/IL-2 согласно этому воплощению (SEQ ID NO: 199). В этой последовательности курсивом показана расщепленная полипептидная последовательность IL-22, а подчеркнутым шрифтом — «непрерывная» последовательность IL-2.

IL-22/IL-2 (фолдикин 22-2_6B; XX_SEQ ID NO: 267-(Xn)-SEQ ID NO: 268-(Xn)-SEQ ID NO: 269_YY)

IL-22 расщеплен и показан в виде остатков, выделенных курсивом. IL-2 является непрерывным и показан в виде подчеркнутых остатков.

XX_CRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVR***LIGEKLFHGVSMSE******RCYLMQVLFNFTLEEVLPQ***
 hhhhhhhhhhhhhhhhhh hhh hhhhhhhhhhhhhhh---hhhh
 HA HB
SDRFQPYMQEVVPFLARLSNRL (Xn) TSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ***MILNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATEL***
 hhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhh hhh
 HC HA
KHLQCLEEELKPLEEVLNLA***OSKNFHLRPRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII******STLT (Xn)***
 hhhhhhh---hhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh

HB	HC	HD
LHIQRNVQKDKDTVKKLGESEGEIKAI GELDLLFMSLRNACI-YY		
hhhhhhhhhhhhhhhhhh	hhhhhhh	hhhhhhhhhhhh
HD	HE	HF

Пример 4: Проектирование линкеров в различных каркасах фолдикинов и идентификация размыкаемых петель.

Методы

Создание кольцевых перестановочных элементов

Общий протокол для создания кольцевых перестановочных элементов для интерлейкинов выполняется путем, во-первых, проектирования интралинкера соответствующей структуры с закрытием естественных NC-концов (с использованием команды Bridging из ModelX). Эта первая стадия является общей для каждого отличного интерлейкина и создает структурную модель, представленную непрерывной последовательностью. Затем создается кольцевой перестановочный элемент путем разрыва пептидной связи в непрерывной последовательности и изменения ее нумерации, начиная с нового N-конца (остатка в месте разрыва). Выбор разных остатков в месте разрыва приводит к получению разных перестановочных элементов. Выбираемыми остатками в месте разрыва являются те, которые обладают меньшими стабилизирующими свойствами в каждой кристаллографической структуре.

Используемые структуры PDB:

Для IL-2 мы использовали структуру PDB для моделирования белка 5lqb, для IL-22 бвео, для IFN β 1au1 и для GMCSF 2gmf.

Проектирование интралинкеров с использованием программного обеспечения ModelX и FoldX:

Новая связь, соединяющая естественные Nt и Ct целевых IL (IntraLinker), была разработана с помощью набора инструментов ModelX. Использовалась команда мостикового соединения ModelX Bridging (режим Cross-Linking); эта команда соединяет пару остатков, выбранных в качестве якорей, со всеми геометрически совместимыми фрагментами из специально созданной библиотеки белковых фрагментов (PerXDB_5k). Команда мостикового соединения позволяет пользователю выбирать пептиды различной длины; Результатом является ансамбль мостиковых моделей, в которых отбрасываются линкеры/соединения с запрещенными фи- и пси-диэдрами на графике Рамачандрана или имеющие нежелательные пересечения каркаса.

Когда пептиды длиннее числовых положений между якорями, команда мостикового соединения перенумеровывает избыточные остатки с помощью ges-кодов, которые не распознаются FoldX на дальнейших стадиях моделирования. По этой причине

конструкция кольцевого перестановочного элемента потребовала численной перестановки остатков мономерного белка после разрыва в указанном положении и связывания природных Nt и Ct. Мостиковое соединение также заменяет все краевые остатки между якорями на остатки пептида.

Для закрытия NC-концов данной структуры проводился обширный скрининг линкеров путем прогона моделей через алгоритм мостиковых соединений с исчерпывающими комбинациями точек привязки в перекрывающемся скользящем окне вокруг флангов соединяемых областей. В каждом окне запрашивали пептиды разной длины (от 6 до 20 а.к.). Мостиковые модели восстанавливаются по боковым цепям с помощью команды RepairPDB в FoldX (Delgado et al, 2019), при этом полученные модели ранжируются по глобальной энергии (команда FoldX Stability). Затем прогоняли на линкере и прилегающих остатках мутагенез со сканированием положения (PSSM) из FoldX для идентификации мутаций, которые оптимизируют упаковку с IL и соответствующими рецепторами.

Получение плазмид

Все плазмиды, полученные в этой работе, были собраны по способу Гибсона (Gibson et al, Nat Methods 6, 343–345 (2009)). При необходимости генный синтез (двухцепочечные фрагменты gBlock) и синтез олигонуклеотидов проводили в корпорации Integrated DNA Technologies (IDT). Амплификацию гена проводили с помощью ДНК-полимеразы Phusion (Thermo Fisher Scientific) и трансформировали в компетентные клетки DH5-альфа *Escherichia coli* (NEB).

Для экспрессии белка млекопитающих в клетках ExpiCHO использовали вектор pcDNA3.1 (V790-20, Invitrogen). Для экспрессии бактериального белка с использованием клеток *Mycoplasma pneumoniae* M129 использовали транспозоны, полученные из Tn4001 (Lyon et al., Mol Gen Genet. 1984; 193(3):554-6). В случае *Mycoplasma pneumoniae* мы использовали синтетический промотор P3 (Yus et al, Nat Commun. 2017 Aug 28;8(1):368) и для всех вариантов использовали сигнал секреции *M. pneumoniae* (s142) (патент США 10745450).

Все плазмиды проверили секвенированием по Сэнгеру (Eurofins Genomics).

Экспрессия белка с использованием системы ExpiCHO

Клетки набора ExpiCHO для экспрессии белка приобрели у ThermoFisher (A29133). Для мелкомасштабного производства (2,5 мл) использовали планшеты с 24 глубокими лунками (AXYPDW10ML24CS, Merck), покрытые газопроницаемой пленкой (ThermoFisher). В день -1 от начала продуцирования клетки ExpiCHO разделяли до конечной плотности 3×10^6 жизнеспособных клеток/мл. Выращивали при 37°C, 8% CO₂ и

встряхивании со скоростью 110 об/мин. В день 0 продуцирования клетки ExpiCHO разделяли до конечной плотности 3×10^6 жизнеспособных клеток/мл на образец и аликвоты по 2,5 мл клеточной суспензии помещали в лунки планшета. Для каждого образца мы приготовили 2 мкг ДНК в 200 мкл холодного OptiPRO SFM с 9,0 мкл реагента ExpiFectamine CHO (комлексообразующая смесь) и добавили в каждую лунку планшета. Планшет закрывали газопроницаемым изолирующим слоем и инкубировали при 37°C, 8% CO₂ и 225 об/мин. На первый день, через 18–22 часа после трансфекции, в каждую лунку добавляли ExpiFectamine CHO Enhancer и ExpiCHO Feed. Для всего планшета из 24 лунок смешивали 400 мкл ExpiFectamine CHO Enhancer и 16 мл ExpiCHO Feed в конической пробирке. Из этой смеси в каждую лунку планшета добавляли по 600 мкл. Затем планшеты инкубировали при 37°C, 8% CO₂ и 225 об/мин в течение 4 дней, а затем собирали.

Количественное определение белка с помощью ELISA

Продуцирование представляющих интерес белков, экспрессируемых в *Mycoplasma pneumoniae* M129 или экспрессируемых в ExpiCHO, количественно оценивали с помощью ELISA. Каждый из различных экспериментов проводился в соответствии с инструкциями производителя для IFN-бета (Human IFN-beta DuoSet ELISA, Biotechne), IL-10 (ELISA MAXTM Deluxe Set Human IL-10, Biolegend), IL-22 (ELISA MAXTM Deluxe Set Human IL-22, Biolegend) и IL-2 (ELISA MAXTM Deluxe Set Human IL-2, Biolegend).

Количественное определение белка с помощью масс-спектрометрии

Для вариантов IFN-β и вариантов IL-22 результаты ELISA по количественному определению белка были подтверждены с помощью масс-спектрометрии. Для подготовки образцы, полученные после гидролиза в растворе, восстанавливали дитиотреитолом (30 нмоль, 1 час, 37°C) и алкилировали в темноте йодацетамидом (60 нмоль, 30 мин, 25°C). Полученный белковый экстракт сначала разбавляли 1/3 200 мМ NH₄HCO₃ и расщепляли 1 мкг LysC (Wako, кат. № 129-02541) в течение ночи при 37°C, а затем разбавляли 1/2 и расщепляли 1 мкг трипсина (Promega, кат. № V5113) в течение восьми часов при температуре 37°C. После расщепления смесь пептидов подкисляли муравьиной кислотой и обессоливали на колонке MicroSpin C18 (The Nest Group, Inc) перед анализом ЖХ-МС/МС. Для хроматографического и масс-спектрометрического анализа образцы анализировали с использованием масс-спектрометра Orbitrap Eclipse (Thermo Fisher Scientific, Сан-Хосе, Калифорния, США), соединенного с EASY-nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific (Proxeon), Оденсе, Дания). Пептиды загружали непосредственно в аналитическую колонку и разделяли обращенно-фазовой хроматографией с использованием колонки длиной 50 см с внутренним диаметром 75 мкм, заполненной

частицами C18 размером 2 мкм и спектрометра (Thermo Scientific, Сан-Хосе, Калифорния, США).

Хроматографические градиенты стартовали с 95% буфера А и 5% буфера В со скоростью потока 300 нл/мин и постепенно увеличивались до 25% буфера В и 75% А за 79 минут, а затем до 40% буфера В и 60% А за 11 минут. После каждого анализа колонку промывали в течение 10 мин 100% буфером В. Буфер А: 0,1% муравьиной кислоты в воде. Буфер В: 0,1% муравьиной кислоты в 80% ацетонитриле (январь 2019 г.).

Масс-спектрометр работал в режиме положительной ионизации с напряжением нанораспыления, установленным на уровне 2,4 кВ, и температурой источника 305°C. Сбор данных проводили в информационно-зависимом режиме сбора данных (data-dependent acquisition, DDA), а полное MS-сканирование с 1 микросканированием с разрешением 120 000 использовали в диапазоне масс m/z 350-1400 с детектированием в масс-анализаторе Orbitrap. Автоматическая регулировка усиления (APU) была установлена на «стандарт», а время ввода образца — на «авто». В каждом цикле анализа информационно-зависимого сбора данных, после каждого обзорного сканирования, для фрагментации отбирали наиболее интенсивные ионы, превышающие пороговое количество ионов 10 000. Количество выбранных ионов-предшественников для фрагментации определяли с помощью алгоритма сбора данных «Максимальная скорость» и динамического исключения в течение 60 секунд. Спектры фрагментированных ионов были получены с помощью диссоциации, индуцируемой высокоэнергетическим соударением (HCD), при нормированной энергии столкновения 28% и получены в масс-анализаторе с ионной ловушкой. APU установили на 2E4, использовали окно изоляции 0,7 m/z и максимальное время ввода образца 12 мс. Гидролизированный бычий сывороточный альбумин (кат. номер P8108S New England Biolabs) анализировали между образцами для того, чтобы избежать загрязнения предыдущим образцом и гарантировать стабильность прибора, а QCloud (Chiva et al. (2018) PLoS One. Jan 11;13(1)) использовали для контроля лонгитюдной эффективности прибора в ходе осуществления проекта. Для анализа данных полученные спектры анализировали с использованием пакета программного обеспечения Proteome Discoverer (v2.0, Thermo Fisher Scientific) и поисковой системы Mascot (v2.6, Matrix Science; Perkins, et al. (1999) Electrophoresis. Dec;20(18):3551-67). Поиск данных проводили в справочной базе данных Swiss-Prot по китайскому хомяку (по состоянию на ноябрь 2022 года, 23 885 записей), а также в перечне (Beer et al (2017) Methods Mol Biol. 1619:339-352) обычных загрязнителей и всех соответствующих ложных записей. Для идентификации пептида для уровня MS1 использовали допуск по массе ионов-предшественников 7 ppm, в качестве фермента выбирали трипсин и допускали до трех пропущенных расщеплений.

Допуск по массе фрагментных ионов был установлен равным 0,5 Да для спектров MS2. Окисление метионина и ацетилирование N-концевого белка использовали в качестве переменных модификаций, тогда как карбамидометилирование цистеинов считали фиксированной модификацией. Уровень ложноположительных результатов (FDR) при идентификации пептидов приняли равным максимум 5%.

Данные количественного определения пептидов были получены из узла «Квантификатор ионов-предшественников» из Proteome Discoverer (v2.0) с использованием допуска по массе 2 м.д. для ионного тока, экстрагированного пептидом (XIC).

Культура репортерных клеток HEK blue IL

Клеточные линии HEK-blueTM, несущие репортерную конструкцию SEAP, приобрели у InvivoGen (InvivoGen, Сан-Диего, Калифорния, США). В этой работе мы использовали репортерные клетки IFN- α/β HEK 293 (hkb-ifnab), репортерные клетки IL-2 и IL-15 человека (hkb-il2bg), репортерные клетки IL-22 человека и мыши (hkb-il22) и репортерные клетки IL-10 человека (hkb-il10). Мы использовали клетки HEK-Dual (два репортера: SEAP и Lucia) для обнаружения IFN-гамма (репортерные клетки с IFN- γ человека SEAP/люциферазой, hkd-ifng).

Клетки выращивали в среде DMEM (Lonza, BE12-604F) с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамин и определенных производителем селективных антибиотиков в каждой из различных репортерных клеток. Клетки пассировали при достижении 70% конfluence, следуя рекомендациям производителя.

Колориметрический анализ в клетках HEK-blueTM

После количественного определения надосадочной жидкости с помощью ELISA образцы корректировали так, чтобы они соответствовали динамическому диапазону репортерных клеток HEK, используя среду DMEM для выполнения различных разведений. Каждую максимальную концентрацию устанавливали для каждой репортерной клетки так, чтобы она соответствовала насыщению, и для каждого образца выполняли 8 серийных разведений (каждое разведение 0,5X). Затем репортерные клетки HEK готовили в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 180 мкл клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет (Nunc Microwell, ThermoFisher Scientific, #167008). Затем добавляли по 20 мкл каждой надосадочной жидкости с заданной концентрацией и выдерживали клетки в течение 20–24 часов при 37°C и 5% CO₂ (индуцированные HEK-blueTM). После этого 180 мкл раствора QUANTI-Blue (среда для обнаружения щелочной фосфатазы, #repqbs, InvivoGen) смешивали с 20 мкл индуцированных клеток HEK-blueTM в новом 96-луночном планшете. Затем клетки

инкубировали 60 минут при 37°C и измеряли поглощение (630 нм) на спектрофотометре Tecan i-control, 2.0.10.0.

Вывод данных EC-50

Для каждого из условий молярную концентрацию рассчитывали с учетом молекулярной массы. Для «фолдикинов» считалось, что обе субъединицы белка активны, и поэтому мы использовали молекулярную массу мономера в случае гомофолдикина (два одинаковых домена). Когда фолдикин является гетерофолдикином, мы определяли его содержание, используя антитело против одного из фолдикинов, и рассматривали молекулярную массу каждого IL для определения молярности. Различные показатели поглощения с вычтенным фоном подгоняли по уравнению Михаэлиса-Ментен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.

Результаты

Способ В получения фолдикина - цитокина класса I (например, IL-2)

Перечень протестированных вариантов выглядит следующим образом:

- IL2 WT (IL-2 дикого типа, экспрессируемый и секретируемый эукариотными клетками, т.е. клетками CHO)
- ORK2-006: фолдикин-2, соединенный через два 6 ак интерлинкера с ак последовательностью GPPPPG (SEQ ID NO:270).
- ORK2-007: фолдикин-2, соединенный через два 7 ак интерлинкера с ак последовательностью GPPPPPG (SEQ ID NO: 271).
- ORK2-008: фолдикин-2, соединенный через два 8 ак интерлинкера с ак последовательностью GPPPPPPG (SEQ ID NO: 272).
- ORK2-009: фолдикин-2, соединенный через два 6 ак интерлинкера с ак последовательностью GGGSGG (SEQ ID NO: 273).
- ORK2-010: фолдикин-2, соединенный через два 7 ак интерлинкера с ак последовательностью GGGSGGG (SEQ ID NO: 274).
- ORK2-011: фолдикин-2, соединенный через два 8 ак интерлинкера с ак последовательностью GGGSGGGG (SEQ ID NO: 275).

Использовали следующие аминокислотные последовательности (помечены только канонические α -спирали; подчеркнутая последовательность является сигналом секреции *M. pneumoniae*):

>IL2 WT (SEQ ID NO: 79)

MYRQQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A
 hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhh
 НА
 TELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
 hhhhhh---hhhhhhhh hhhhh-hhhhhhhhh hhhhhh

HB HC HD
 WITFCQSIISTLT*
 hhhhhhhhhhh
 HD

>ORK2-006 6 ак линкер PolyPro (SEQ ID NO: 313)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII
 hhhh-hhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
 STLT**GPPPPG**TKKTQLQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPL
 h hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhh---hhh
 HA HB
 LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII STLT**GP**
 hhhh hhhh-hhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh
 HB HC HD
PPPGTKKTQLQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLN
 Hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhh---hhh
 HA HB
 LAQS*

>ORK2-007 7 ак линкер PolyPro (SEQ ID NO: 276)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII
 hhhh-hhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
 STLT**GPPPPPG**TKKTQLQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPL
 h hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhh---hhh
 HA HB
 LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII STLT**GP**
 hhhh hhhh-hhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh
 HB HC HD
PPPPGTKKTQLQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLN
 Hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhh---hhh
 HA HB
 LAQS*

>ORK2-008 8 ак линкер PolyPro (SEQ ID NO: 277)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII
 hhhh-hhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
 STLT**GPPPPPG**TKKTQLQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPL
 h hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhh---hh
 HA HB
 PLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII STLT**G**
 hhhh hhhh-hhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh
 HB HC HD
PPPPPGTKKTQLQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEV
 hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhh---hhhhhhh
 HA HB
 LNLAQS*

>ORK2-009 6 ак линкер PolyGly (SEQ ID NO: 278)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII
 hhhh-hhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh
 HC HD
 STLT**GGGSGG**TKKTQLQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPL
 h hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhh---hhh
 HA HB
 EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII STLT**GGG**
 hhh hhhh-hhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh
 HB HC HD

Приведенные выше результаты позволяют предположить, что в случае IL-2 неспроектированный гибкий (polyGly) или жесткий линкер (PolyPro), по-видимому, не являются важными.

Путь А получения фолдикина - цитокина класса II (например, IL-22)

Использовались следующие аминокислотные последовательности (помечены только канонические α -спирали; сигнальный пептид IL-22 заменен сигнальным пептидом *M. pneumoniae* - см. «Методы»):

>ORK22-016 короткий 1 ак линкер Gly, линкер Nt-Ct выделен жирным курсивом (SEQ ID NO: 281)

```

                                         ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIG
                                         hhhhhhhhhhhhhhhhh
                                         HA
EKLFGVSMSEKCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSGGHIQRNVQKLKDTVKKLGES
          hhhhhhhhhhhhhhhhh                    hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh h
          HB                                HC                                HD
GEIKAIGELDLLFMSLRNACIANGVLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMS
hhhhh   hhhhhhhhhhhhhhhhh                    hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
HE      HF                                HA
ERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSGGHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI
hhhhh   hhhhhhhhhhhhhhhhh                    hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhh
          HB                                HC                                HD                                HE
GELDLLFMSLRNACI*
          hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HF

```

>ORK22-017 короткий 3 ак линкер Gly, линкер Nt-Ct выделен жирным курсивом и подчеркнут (SEQ ID NO: 282)

```

                                         ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIG
                                         hhhhhhhhhhhhhhhhh
                                         HA
EKLFGVSMSEKCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSGGGGHIQRNVQKLKDTVKKLG
          hhhhhhhhhhhhhhhhh                    hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HB                                HC                                HD
ESGEIKAIGELDLLFMSLRNACIANGVLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVS
hhhhh   hhhhhhhhhhhhhhhhh                    hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
HE      HF                                HA
MSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSGGGGHIQRNVQKLKDTVKKLGESGE
          Hhhhhhhhhhhhhhhhh                    hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhh
          HB                                HC                                HD                                HE
IKAIGELDLLFMSLRNACI*
hhhh   hhhhhhhhhhhhhhhhh
HE      HF

```

>ORK22-018 длинный 6 ак линкер polyGly, линкер Nt-Ct выделен жирным курсивом и подчеркнут (SEQ ID NO: 283)

```

                                         ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIG
                                         hhhhhhhhhhhhhhhhh
                                         HA
EKLFGVSMSEKCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSGGGSGGGHIQRNVQKLKDTVK
          hhhhhhhhhhhhhhhhh                    hhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HB                                HC                                HD
KLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACIANGVLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFH
h hhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh                    hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
          HE      HF                                HA
GVSMSEKCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSGGGSGGGHIQRNVQKLKDTVKK

```



```

          hhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HB                HC                HD
LGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI*
  hhhhhh  hhhhhhhhhhh
  HE      HF

```

>ORK22-019 длинный 9 ак линкер polyGly, Линкер Nt-Ct выделен жирным курсивом и подчеркнут (SEQ ID NO: 284)

```

          ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIG
          hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HA
EKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLS GGGSGGSGGHIQRNVQKLD
  hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HB                HC                HD
TVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI ANGVLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEK
  hhhh  hhhhhh  hhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh
  HD      HE      HF                HA
LFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLS GGGSGGSGGHIQRNVQKL
  Hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HB                HC                HD
KDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI*
  hhhhhh  hhhhhh  hhhhhhhhhhh
  HD      HE      HF

```

>ORK22-020 длинный 12 ак линкер polyGly, Линкер Nt-Ct выделен жирным курсивом и подчеркнут (SEQ ID NO: 285)

```

          ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIG
          hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HA
EKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLS GGGSGGSGGSGGHIQRNVQK
  Hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HB                HC                HD
LKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI ANGVLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLI
  hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh
  HD      HE      HF                HA
GEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLS GGGSGGSGGSGGHIQ
  hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HB                HC                HD
RNVQKLDKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI*
  hhhhhhhhhhhhhhhhh  hhhhhh  hhhhhhhhhhh
  HD      HE      HF

```

>ORK22-024 3 ак линкер PolyPro. Линкер Nt-Ct выделен жирным курсивом и подчеркнут (SEQ ID NO: 286).

```

          ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIG
          hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HA
EKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLS GPGHIQRNVQKLDKDTVK
  Hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HB                HC                HD
KLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI ANGVLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFH
  h  hhhhhh  hhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh
  HE      HF                HA
GVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLS GPGHIQRNVQKLDKTVK
  hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhh
          HB                HC                HD
LGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI*
  hhhhhh  hhhhhhhhhhh
  HE      HF

```

>ORK22-025 9 ак линкер PolyPro. Линкер Nt-Ct выделен жирным курсивом и подчеркнут (SEQ ID NO: 287)

ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIG
 hhhhhhhhhhhhhhhh
 HA
 EKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLS**GPPPPPPPGH**IQRNVQKLDK
 hhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhh
 HB HC HD
 TVKKLGESEGEIKAIGELDLLFMSLRNACI**ANGV**LDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEK
 hhhh hhhhhh hhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh
 HD HE HF HA
 LFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLS**GPPPPPPPGH**IQRNVQKL
 hhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhh
 HB HC HD
 KDTVKKLGESEGEIKAIGELDLLFMSLRNACI*
 dhhhhh hhhhhh hhhhhhhhhhhh
 HD HE HF

>ORK22-026 11 ак линкер PolyPro. Линкер Nt-Ct выделен жирным курсивом и подчеркнут (SEQ ID NO: 288)

ARLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIG
 hhhhhhhhhhhhhhhh
 HA
 EKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLS**GPPPPPPPPPGH**IQRNVQKL
 hhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhh
 HB HC HD
 KDTVKKLGESEGEIKAIGELDLLFMSLRNACI**ANGV**LDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIG
 hhhhhh hhhhhh hhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh
 HD HE HF HA
 EKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLS**GPPPPPPPPPGH**IQRN
 hhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhh
 HB HC HD
 VQKLDKDTVKKLGESEGEIKAIGELDLLFMSLRNACI*
 hhhhhhhhhhhh hhhhhh hhhhhhhhhhhh
 HD HE HF

Результаты

Результаты, полученные с фолдикином 22 класса А и линкерами разной длины и/или разного состава (на основе Gly-Ser или пролина), показаны на Фигуре 36 (ORK22-17 - ORK22-19 и ORK22-24 - ORK22-26). Ни один из этих фолдикинов с линкерами PolyGly или PolyPro различной длины не оказался активным при экспрессии в *M. pneumotoniae*. Только фолдикин 22 класса А с специально разработанными линкерами (MutSC1 и MutSC2) приводил к усилению функции.

Путь В получения фодикина - цитокина класса II (например, II-22)

Перечень протестированных вариантов выглядит следующим образом:

- ORK22-012: Фолдикин-22, связанный с двумя 10 ак интерлинкерами с ак последовательностью GGPPPPPPGG (SEQ ID NO: 289), соединяющей природные Nt и Ct двух молекул II-22.
- ORK22-014: Фолдикин-22, связанный с двумя 10 ак интерлинкерами с

ак последовательностью GGGGGGGGGA (SEQ ID NO: 290), соединяющей природные Nt и Ct двух молекул IL-22.

Использовались следующие аминокислотные последовательности (помечены только канонические α -спирали; сигнальный пептид IL-22 заменен сигнальным пептидом *M. pneumoniae* - см. «Методы»):

>IL22_WT (SEQ ID NO: 291)

```

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLLALLVQGAAAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNT
                                                                                   hhhhhhhhhhhhhhhhh
                                                                                   HA
DVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLH
                   hhhhhhhhhhhhhhhhh                   hhhhhhhhhhhhhhhhh
                   HB                               HC
IQRVNQKDKDQVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI
hhhhhhhhhhhhhhhh  hhhhhhh  hhhhhhhhhhhhhhh
                   HD                   HE                   HF

```

>ORK22-012 10 ак линкер PolyPro (SEQ ID NO: 292)

```

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLLALLVQGAAAPISSESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI GGGPPPPPPGG
                                                                                   hhhhhhh  hhhhhhhhhhhhh
                                                                                   HE                   HF
APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEV
                   hhhhhhhhhhhhhhhhhhh                   hhh                   hhhhhhhhhhhhhhh
                   HA                               HB
LFPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKDKDQVKKLGESGEIKAI GELDLLFMS
                   hhhhhhhhhhhhhhhhhhh                   hhhhhhhhhhhhhhhhh  hhhhhhh  hhhhhhh
                   HC                               HD                   HE                   HF
LRNACI GGGPPPPPPGGAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSE
hhhhhh                   hhhhhhhhhhhhhhhhhhh                   hhh
HF                               HA
RCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKDKDQVKKLG
hhhhhhhhhhhhhhhh                   hhhhhhhhhhhhhhhhh                   hhhhhhhhhhhhhhhhh
                   HB                               HC                               HD

```

>ORK22-014 10 ак линкер PolyGly (SEQ ID NO: 293)

```

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLLALLVQGAAAPISSESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI GGGGGGGGGGGG
                                                                                   hhhhhhh  hhhhhhhhhhhhh
                                                                                   HE                   HF
APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEV
                   hhhhhhhhhhhhhhhhhhh                   hhhhhhhhhhhhhhhhh
                   HA                               HB
LFPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKDKDQVKKLGESGEIKAI GELDLLFMS
                   hhhhhhhhhhhhhhhhhhh                   hhhhhhhhhhhhhhhhh  hhhhhhh  hhhhhhh
                   HC                               HD                   HE                   HF
LRNACI GGGGGGGGGGGGAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSE
hhhhhh                   hhhhhhhhhhhhhhhhhhh                   hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
HF                               HA
RCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKDKDQVKKLG
hhhhhhhhhhhhhhhh                   hhhhhhhhhhhhhhhhh                   hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                   HB                               HC                               HD

```

Результаты

Различные конструкции транзиторно трансформировали в клетки ExpiCHO, как описано в разделе «Методы». Клетки ExpiCHO вырастили, как описано в разделе «Методы»,


```

HD
> Линкер IL2-IL4 PolyPro (SEQ ID NO: 295)
MYRMQLLSICIALSLALVTNSLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII
                hhhhh-hhhhhhhhhhh                hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                IL-2 HC                            IL-2 HD
STILTGPPPPPGHKCDITLQEI IKTLSLNLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHH
H                hhhhhhhhhhhhh                hhh                hhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                IL-4 HA                            IL-4 HB
EKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKQANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS
                hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh                hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                IL-4 HC                            IL-4 HD
GPPPPPGTKKKTQLQLEHLLLDLQMI LGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLLQCLEEELKPLEEV
                hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh                hhhhhhhhh--hhhhhh
                IL2-HA                            IL-2 HB
LNLAQS*

```

Результаты

Различные конструкции транзиторно трансформировали в клетки ExpiCHO, как описано в разделе «Методы». Клетки ExpiCHO вырастили, как описано в разделе «Методы», и через 4 дня собрали надосадочные жидкости и рассчитали с помощью ELISA концентрацию различных сконструированных молекул. Затем мы выполнили серийные разведения, начиная с 20 нг/мл (каждое разведение 0,5X), и оценили активацию репортерных синих клеток НЕК IL-2 и IL-4 (см. Фигуры 38-39).

Мы подобрали математическую модель Михаэлиса-Ментен к экспериментальным данным (см. методы) и получили кажущийся EC-50 (Таблица 16).

IL-2 НЕК	IL-2 WT (CHO)	IL2-IL4 линкер PolyPro
Vmax	= 1,000	= 1,000
EC-50	1719E-10	3,527E-11
IL-4 НЕК	IL-4 положительного контроля (рекомбинантный)	IL2-IL4 линкер PolyPro
Vmax	= 2,400	= 2,400
EC-50	1,232E-10	4,074E-10

Таблица 16: Параметры подбора. Vmax приняли равным 1,0 для подбора данных НЕК IL-2 и 2,4 для данных НЕК IL-4.

Мы обнаружили, что химерный фолдикин обладает более высокой активностью, чем цитокин IL-2 WT, и немного меньшей, чем коммерчески приобретенный IL-4 (в данном случае разница незначительна, поскольку в одном случае фолдикин экспрессировался в клетках CHO и определялся количественно с помощью ELISA, в то время как другой был приобретен у Biotechne (6507-IL-010/CF).

Способ С получения фодикина - цитокина класса I (например, IL-2)

Используемые варианты и их последовательности представлены ниже:

>IL2 WT (SEQ ID NO: 79)

```

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A
                               hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhhhh             sss
                                       HA
TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
   hhhhhh---hhhhhhh             hhhh-hhhhhhhh             sss             hhhhhh
           HB                               HC                               HD
WITFCQSIIISTLT*
hhhhhhhhhhhh
HD

```

ORK_013: Кольцевой перестановочный элемент пути С для фолдикина IL-2, в котором один мономер имеет петлю, раскрытую для связывания этого мономера с природными Nt и Ct другого мономера IL-2 через два интерлинкера длиной 3 с последовательностью GTS.

>ORK2_013 (SEQ ID NO: 296)

```

MYRMQLLSCIALSLALVTNSNFLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS
                               hhhh-hhhhhhhhhh             hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                                       HC                               HD
IIISTLTGGSGGFLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIISTLTGGT
hhh             hhhhh-hhhhhhhhhh             hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhs
HD             HC                               HD
SSSTKKTQQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A
   hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhhhh---hhhhhhh
           HA                               HB
QSKGGSGGTTSSSTKKTQQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K
   hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhhhh---hh
           HA                               HB
PLEEVLNLAQSK
hhhhh

```

Результаты

Различные конструкции транзиторно трансформировали в клетки ExpiCHO, как описано в разделе «Методы». Клетки ExpiCHO выращивали, как описано в разделе «Методы», и через 4 дня собирали надосадочные жидкости и рассчитывали с помощью ELISA концентрацию различных сконструированных молекул. Затем мы проводили серийные разведения, начиная с 20 нг/мл (каждое разведение 0,5X), и оценивали активацию репортера IL-2 в клетках HEK blue (см. фигуру 40).

Мы подобрали математическую модель Михаэлиса-Ментен к экспериментальным данным (см. методы) и получили кажущийся EC-50 (Таблица 17).

	IL2 WT ORF	ORK2_013
V _{max}	= 0,7000	= 0,7000
EC-50	5,298E-10	6,371E-10

Таблица 17: Параметры подбора. Параметры Hillslope и Bottom после подбора кривой для каждого мутанта. Белки экспрессировали с помощью CHO в качестве системы экспрессии. V_{max} зафиксировали равным 0,7.

Мы обнаружили, что химерный фолдикин Пути С активен, хотя и имеет несколько

более низкую EC-50.

IFN-гамма (цитокин класса II, образующий обменяемый домен)

Перечень вариантов

ORKIFNg-002

Перечень последовательностей

Линкер Nt-Ct выделен жирным курсивом ASKPHPGQLWY (SEQ ID NO: 17)

Мутации выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

В качестве IFNg WT мы использовали кристаллизованную версию IFNg из PDB 6e3k.

>IFNg WT (SEQ ID NO: 312)

```
SQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKFNKDDQSIQKSVET
      hhhhhhhhhhhhh      hh      hhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhh
          HA                                  HB                                  HC
IKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPAA*
      hhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhhhhh      hhhhhh
          HC          HD          HE          HF
```

>ORKIFNg-002 (SEQ ID NO:18)

```
GSQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKFNKDDQSIQK
      hhhhhhhhhhhhh      hh      hhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh      hh
          HA                                  HB
SVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMASKPHPGQLWA
      hhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhhhhh      hhhhhh
          HC          HD          HE          HF
YVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKFNKDDQSIQKSVETI
      hhhhhhhhhhhhh      hh      hhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhh
          HA                                  HB                                  HC
KEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPAA
      hhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhh      hhhhhhhhh      hhhhhh
          HC          HD          HE          HF
```

Результаты

Различные конструкции транзиторно трансформировали в клетки ExpiCHO, как описано в разделе «Методы». Клетки ExpiCHO выращивали, как описано в разделе «Методы», и через 4 дня надосадочные жидкости собирали и рассчитывали концентрацию различных сконструированных молекул с помощью ELISA (Фигура 43).

Мы подогнали модель Михаэлиса-Ментен к экспериментальным данным (см. методы) и получили кажущиеся EC-50 (Таблица 18).

	IFNg WT	SCIFNg_002
Bottom	2549	9151
Hillslope	Нестабильный	Нестабильный
Top	Нестабильный	Нестабильный
EC50	8,661E-11	3,282E-11

Таблица 18: Параметры подбора. Параметры Hillslope и Bottom после подбора кривой для каждого мутанта. Белки экспрессировали с использованием *Mycoplasma pneumoniae* в качестве экспрессирующего вектора.

Мы обнаружили, что фолдикин IFNG имеет более низкую EC-50, чем IFNg дикого типа.

Определение подходящих петель для размыкания: кольцевые перестановочные элементы

Очень важно для определения того, какую петлю разомкнуть для фолдикинов класса В, где мы соединяем естественные Nt и Ct двух молекул, и нам нужно разомкнуть петлю.

Для фолдикинов класса А и класса С это менее важно, поскольку петля, которая при размыкании в результате круговой перестановки может дестабилизировать белок, может быть спасена путем связывания новых Nt и Ct, возникающих в результате размыкания петли, с другим IL через его естественные Nt и Ct (Класс С) или через другую разомкнутую петлю (Класс А).

Несмотря на это, если это геометрически осуществимо и совместимо со связыванием с рецептором, всегда лучше разомкнуть петлю, которая не дестабилизирует белок.

IL-22

(Использование структуры 3dlq.pdb и средства просмотра SwissPDB для определения вторичной структуры). В зависимости от кристалла и комплекса длина канонических спиралей может меняться.

#IL-22-специфичный линкер Nt-Ct представляет собой TDYDSQTN (SEQ ID NO: 303).

Сигнальный пептид #IL-22 MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAA (SEQ ID NO: 348)

Петли в серых прямоугольниках

h альфа-спираль

c Цепь

Мы показали только петли и все элементы вторичной структуры, кроме канонических альфа-спиралей HA, HB, HC, HD, HE и HF для последовательности WT (IL22_WT).

IL22_cutasn68 Петля разомкнута между 67-68 (петля 67-88,1AB)

IL22_cut77 Петля разомкнута между 76-77 (петля 66-88,1aB)

IL22_cut86 Петля разомкнута между 85-86 (петля 66-88,1AB)

IL22_cut109 Петля разомкнута между 108–109 (петля 102–113,1BC)

IL22_cut135 Петля разомкнута между 134–135 (петля 129–140, LCD)

IL22_cut156 Петля разомкнута между 164-165 (петля 165-167, IEF)

петля 155-157 (IDE) имеет очень неблагоприятную ориентацию, которая препятствует присоединению к другому цитокину, и не тестировалась.

>IL22_WT (SEQ ID NO: 291)

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNT
LAB
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh


```

                                HA
                                1CD
                                1BC
                                1AB
DVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLH
                                hhhhhhhhhhhhhhh
                                HB
                                HC
                                1DE
                                1EF
IQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI
hhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhhhh
                                HD
                                HE
                                HF

```

>IL22_cutasn68 (петля разомкнута между остатками 67-68) (SEQ ID NO: 297)

```

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLLALLVQGGAAANTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQ
                                hhhhhhhhhhhhhhh
                                hB
FPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQ RNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSL
H hhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhh
                                HC
                                HD
                                HE
                                HF
RNAC TDYDSQTN CRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLAD
hhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
HF HA

```

>IL22_cut77 (петля разомкнута между остатками 76-77) (SEQ ID NO: 298)

```

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLLALLVQGGAAEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQ RNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNAC TDYDS
                                hhhhhhhhhhhhhhh
                                HB
YMQEVVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQ RNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNAC TDYDS
H hhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhh
                                HC
                                HD
                                HE
                                HF
QTN CRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIG*
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
HA

```

>IL22_cut86 (петля разомкнута между остатками 85-86) (SEQ ID NO: 299)

```

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLLALLVQGGAAASERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQ RNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNAC TDYDSQTN CRLDKS
                                hhhhhhhhhhhhhhh
                                HB
                                HC
ARLSNRLSTCHIEGDDLHIQ RNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNAC TDYDSQTN CRLDKS
hhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhhhh
                                HC
                                HD
                                HE
                                HF
NFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMS*
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
HA

```

>IL22_cut109 (петля разомкнута между остатками 108-109) (SEQ ID NO: 300)

```

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLLALLVQGGAADRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQ RNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNAC TDYDSQTN CRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADN
                                hhhhhhhhhhhhhhh
                                HB
                                HC
                                HD
QKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNAC TDYDSQTN CRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADN
hhhhhhhh hhhhhhh hhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                                HD
                                HE
                                HF
                                HA
NTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSD*
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
HB

```

>IL22_cut135 (петля разомкнута между остатками 134-135) (SEQ ID NO: 301)

```

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLLALLVQGGAAEGDDLHIQ RNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNAC TDYDSQTN CRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQ
                                hhhhhhhhhhhhhhh
                                HB
                                HD
                                HE
                                HF
MSLRNAC TDYDSQTN CRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQ
hhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhh
HF HA HB
VLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHI*
Hhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                                HB
                                HC

```

```
>IL22_cut156 (петля разомкнута между остатками 164-165) (SEQ ID NO: 302)
MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACTDYDSQTNCRLDKS
                        hhhhhhh   hhhhhhhhhhh
                          HE       HF
NFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLFNFTLEEVLFPQSDRFQPYM
     hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh                       hhhhhhhhhhhhhhh     hh
                      HA                             HB                     HC
QEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKCLKDTPVKKL*
Hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh      hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                        HC              HD
```

IFN-бета

(Использование структуры 1aul.pdb и программы просмотра SwissPDB для определения вторичной структуры). В зависимости от кристалла и комплекса длина канонических спиралей может меняться.

Специфический линкер #IFNb представляет собой EGPG (SEQ ID NO: 304).

Сигнальный пептид #IFNb MTNKCLLQIALLLCFSTTALS (SEQ ID NO: 305)

Петли в серых прямоугольниках

h альфа-спираль

c Цепь

Мы показываем только петли и все элементы вторичной структуры, кроме канонических альфа-спиралей HA, HB, HC, HD, HE и HF для последовательности WT (IL22_WT+sp).

Перечень вариантов

IFNb_cut26 Петля разомкнута между 25-26 (петля 22-29,1AB1)

IFNb_cut50 Петля разомкнута между 49-50 (петля 34-51,1AB2)

IFNb_cut76 Петля разомкнута между 75-76 (петля 71-81,1BC)

IFNb_cut112 Петля разомкнута между 117-118 (петля 108-121,1CD)

IFNb_cut165 добавление линкера Nt-Ct к Nt и Ct WT

>IFNbWT (SEQ ID NO: 306)

```
                               1AB1          1AB2          1AB3
MTNKCLLQIALLLCFSTTALShYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQ
                hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhh         hhhh
                               HA
                        1BC1 1BC2                               1CD
KEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNhETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLH
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hh           hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                HB                             HC
                    1EF
LKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNhFYFINRLTGYL*
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh             hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
                HD                              HE-HF
```

>IFNb_cut165 (добавление расщепленного Nt-Ct интралинкера (выделено жирным шрифтом) к Nt и Ct дикого типа) (SEQ ID NO: 307)

h альфа-спираль

c Цепь

Мы показываем только петли и все элементы вторичной структуры, кроме канонических альфа-спиралей HA, HB, HC, HD, HE и HF для последовательности WT (IL2_WT +sp).

Перечень вариантов

IL2_cut53 Петля разомкнута между 32–33 (петля 29–34;lAB1)

IL2_cut69 Петля разомкнута между 48-49 (петля 69-76;lAB3)

IL2_cut96 Петля разомкнута между 76-77 (петля 91-101;lBC)

IL2_cut121 Петля разомкнута между 100-101 (петля 97-105;lCD1)

>IL2 WT (SEQ ID NO: 79)

	lAB1	lAB2
<u>MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKPNKLTRMLTFKFYMPKKA</u>	hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh	hhhhh sss
	HA	
lAB3	lBC	lCD1
TELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR	hhhhh---hhhhhhhh	hhhhh-hhhhhhhhh
	HB	HC
WITFCQSIIISTLT*		HD
hhhhhhhhhhhh		
	HD	

>IL2_cut53 (петля разомкнута между остатками 32–33) (SEQ ID NO: 321)

<u>MYRMQLLSICIALSLALVTNSNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP</u>	hhhhhhh---hhhhh	hh
	HB	HC
RDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIIISL LPKLG MNKKTQLQLEHLLLDL	Hhh-hhhhhhhhhhhhh	hhhhhhhhhhhhhhhh
	HC	HD
QMILNGINNYK*		HA
hhhhhhh		
	HA	

>IL2_cut69 (петля разомкнута между остатками 48–49) (SEQ ID NO: 322)

<u>MYRMQLLSICIALSLALVTNSKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKG</u>	hhhhhhh---hhhhh	hhhhh-hhhhhhhhh
	HB	HC
SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIIISL LPKLG MNKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKPNKLT	hhhhhhhhhhhhhhhhhh	hhhhhhhhhhhhhhhhhh
	HD	HA
RMLTFKFYMPK*		

>IL2_cut96 (петля разомкнута между остатками 76–77) (SEQ ID NO: 323)

<u>MYRMQLLSICIALSLALVTNSNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ</u>	hhhhh-hhhhhhhhh	hhhhhhhhhhhhhh
	HC	HD
SIISL LPKLG MNKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKPNKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKP	hhhh	hhhhhh---hhh
	HD	HA
LEEVLNLAQSK*		HB
hhh		
HB		

7. Terai, M. *et al.* Human interleukin 10 receptor 1/IgG1-Fc fusion proteins: immunoadhesins for human IL-10 with therapeutic potential. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 1307–1317 (2009).
8. Duncan, S. A. *et al.* Prolonged Release and Functionality of Interleukin-10 Encapsulated within PLA-PEG Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)* 9, (2019).
9. Gorby, C. *et al.* Engineered IL-10 variants elicit potent immunomodulatory effects at low ligand doses. *Sci. Signal.* 13, (2020).
10. Saxton, R. A. *et al.* Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10. *Science* 371, (2021).
11. Steidler, L. *et al.* Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289, 1352–1355 (2000).
12. Cardoso, A. *et al.* The Dynamics of Interleukin-10-Afforded Protection during Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Front. Immunol.* 9, 400 (2018).
13. Braat, H. *et al.* A Phase I Trial With Transgenic Bacteria Expressing Interleukin-10 in Crohn's Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* vol. 4 754–759 (2006).
14. Cypel, M. *et al.* Functional repair of human donor lungs by IL-10 gene therapy. *Sci. Transl. Med.* 1, 4ra9 (2009).
15. Shamskhov, E. A. *et al.* Hydrogel-based delivery of Il-10 improves treatment of bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Biomaterials* 203, 52–62 (2019).
16. Wang, X., Wong, K., Ouyang, W. & Rutz, S. Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* vol. 11 a028548 (2019).
17. Waites, K. B. & Talkington, D. F. *Mycoplasma pneumoniae* and Its Role as a Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 17 697–728 (2004).
18. Wodke, J. A. H. Dissecting the energy metabolism in *Mycoplasma pneumoniae* through genome-scale metabolic modeling. *Mol. Syst. Biol.* 9, 653 (2013).
19. Inamine, J. M., Ho, K. C., Loechel, S. & Hu, P. C. Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. *J. Bacteriol.* 172, 504–506 (1990).
20. Sluijter, M. *et al.* The *Mycoplasma genitalium* MG352-encoded protein is a Holliday junction resolvase that has a non-functional orthologue in *Mycoplasma pneumoniae*. *Molecular Microbiology* vol. 77 1261–1277 (2010).
21. Maier, T. *et al.* Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium. *Molecular Systems Biology* vol. 7 511 (2011).

22. Kühner, S. *et al.* Proteome Organization in a Genome-Reduced Bacterium. *Science* vol. 326 1235–1240 (2009).
23. Scott, M., Gunderson, C. W., Mateescu, E. M., Zhang, Z. & Hwa, T. Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences. *Science* 330, 1099–1102 (2010).
24. Bennett, M. J., Choe, S. & Eisenberg, D. Domain swapping: entangling alliances between proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 91 3127–3131 (1994).
25. Josephson, K. *et al.* Design and analysis of an engineered human interleukin-10 monomer. *J. Biol. Chem.* 275, 13552–13557 (2000).
26. Syto, R. *et al.* Structural and biological stability of the human interleukin 10 homodimer. *Biochemistry* 37, 16943–16951 (1998).
27. Westerhof, L. B. *et al.* 3D Domain Swapping Causes Extensive Multimerisation of Human Interleukin-10 When Expressed In Planta. *PLoS ONE* vol. 7 e46460 (2012).
28. Huffnagle, G. B., Dickson, R. P. & Lukacs, N. W. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunol.* 10, 299–306 (2017).
29. Minshawi, F. *et al.* The Generation of an Engineered Interleukin-10 Protein With Improved Stability and Biological Function. *Front. Immunol.* 11, 1794 (2020).
30. Delgado, J., Radusky, L. G., Cianferoni, D. & Serrano, L. FoldX 5.0: working with RNA, small molecules and a new graphical interface. *Bioinformatics* 35, 4168–4169 (2019).
31. Schymkowitz, J. *et al.* The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res.* 33, W382–8 (2005).
32. Delgado Blanco, J., Radusky, L. G., Cianferoni, D. & Serrano, L. Protein-assisted RNA fragment docking (RnaX) for modeling RNA-protein interactions using ModelX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 24568–24573 (2019).
33. Cianferoni, D., Radusky, L. G., Head, S. A., Serrano, L. & Delgado, J. ProteinFishing: a protein complex generator within the ModelX toolsuite. *Bioinformatics* 36, 4208–4210 (2020).
34. Blanco, J. D., Radusky, L., Climente-González, H. & Serrano, L. FoldX accurate structural protein–DNA binding prediction using PADA1 (Protein Assisted DNA Assembly 1). *Nucleic Acids Research* vol. 46 3852–3863 (2018).
35. Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. STATs in cancer inflammation and

immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* 9, 798–809 (2009).

36. Lastrucci, C. *et al.* Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16(+) monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. *Cell Res.* 25, 1333–1351 (2015).

37. Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M. & Cohen, P. L. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J. Immunol.* 189, 3508–3520 (2012).

38. Heck, H. D. Statistical theory of cooperative binding to proteins. Hill equation and the binding potential. *Journal of the American Chemical Society* vol. 93 23–29 (1971).

39. Tamiya, S., Yoshikawa, E., Suzuki, K. & Yoshioka, Y. Susceptibility Analysis in Several Mouse Strains Reveals Robust T-Cell Responses After *Mycoplasma pneumoniae* Infection in DBA/2 Mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 10 (2021).

40. Somarajan, S. R., Kannan, T. R. & Baseman, J. B. *Mycoplasma pneumoniae* Mpn133 is a cytotoxic nuclease with a glutamic acid-, lysine- and serine-rich region essential for binding and internalization but not enzymatic activity. *Cell. Microbiol.* 12, 1821–1831 (2010).

41. Segovia, J. A. *Mycoplasma Pneumoniae* Cards Toxin Regulates NLRP3 Inflammasome Activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 135 AB153 (2015).

42. Hames, C., Halbedel, S., Hoppert, M., Frey, J. & Stülke, J. Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 191, 747–753 (2009).

43. Sun, L. *et al.* Effect of IL-10 on neutrophil recruitment and survival after *Pseudomonas aeruginosa* challenge. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41, 76–84 (2009).

44. Mauras, A. *et al.* A New Bifidobacteria Expression System (BEST) to Produce and Deliver Interleukin-10 in *Bifidobacterium bifidum*. *Frontiers in Microbiology* vol. 9 (2018).

45. Steidler, L. *et al.* Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289, 1352–1355 (2000).

46. Lindner, H. A., Velásquez, S. Y., Thiel, M. & Kirschning, T. Lung Protection vs. Infection Resolution: Interleukin 10 Suspected of Double-Dealing in COVID-19. *Front. Immunol.* 12, 602130 (2021).

47. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several

hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345 (2009).

48. Yus, E., Yang, J.-S., Sogues, A. & Serrano, L. A reporter system coupled with high-throughput sequencing unveils key bacterial transcription and translation determinants. *Nat. Commun.* 8, 368 (2017).

49. Piñero-Lambea, C. *et al.* Genome Editing Based on Oligo Recombineering and Cas9-Mediated Counterselection. *ACS Synth. Biol.* 9, 1693–1704 (2020).

50. Burgos, R., Weber, M., Martinez, S., Lluch-Senar, M. & Serrano, L. Protein quality control and regulated proteolysis in the genome-reduced organism *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol. Syst. Biol.* 16, e9530 (2020).

51. Chiva, C. *et al.* QCloud: A cloud-based quality control system for mass spectrometry-based proteomics laboratories. *PLoS One* 13, e0189209 (2018).

52. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567 (1999).

53. Beer, L. A., Liu, P., Ky, B., Barnhart, K. T. & Speicher, D. W. Efficient Quantitative Comparisons of Plasma Proteomes Using Label-Free Analysis with MaxQuant. *Methods Mol. Biol.* 1619, 339–352 (2017).

54. Troegeler, A. *et al.* An efficient siRNA-mediated gene silencing in primary human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Immunol. Cell Biol.* 92, 699–708 (2014).

55. Grilló, M.-J., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., Moriyón, I. & Moreno, E. What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet. Res.* 43, 29 (2012).

56. Kamei, A. *et al.* Exogenous remodeling of lung resident macrophages protects against infectious consequences of bone marrow-suppressive chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E6153–E6161 (2016).

57. Hirche, T. O. *et al.* Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Immunol.* 181, 4945–4954 (2008).

58. Victoria Garrido & Carlos Piñero-Lambea, Irene Rodríguez-Arce, Bernhard Paetzold, Tony Ferrar, Marc Weber, Eva García-Ramallo, Carolina Gallo, María Collantes, Iván Peñuelas, Luis Serrano, María-Jesús Grilló, María Lluch-Senar. Engineering a genome-reduced bacterium to eliminate *Staphylococcus aureus* biofilms in vivo. *Molecular Systems Biology*, в печати.

КЛАУЗУЛЫ:

Следующие полипептиды одноцепочечных димерных цитокинов составляют часть изобретения:

A1. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, содержащий: (a) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, при этом первый домен мономера цитокина или его функциональная часть объединен со вторым доменом мономерного цитокина или его функциональной частью с помощью сконструированной пептидной линкерной последовательности, содержащей 5 или менее, 3 или менее или 2 или менее смежных остатков Gly и/или Ser.

A1A. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A1, где пептидный линкер имеет последовательность из:

- (i) от около 3 до около 20 аминокислот;
- (ii) от около 3 до около 16 аминокислот;
- (iii) от около 3 до около 12 аминокислот;
- (iv) от около 3 до около 8 аминокислот;
- (v) от около 4 до около 8 аминокислот; или
- (vi) от около 4 до около 6 аминокислот.

A2. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A1 или клаузуле A1A, где полипептид одноцепочечного димерного цитокина имеет третичную структуру, включающую левый 3D-домен цитокина и правый 3D-домен цитокина, и при этом левый 3D-домен цитокина соединен с правым 3D-доменом цитокина двумя мостиковыми линкерными пептидами.

A3. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A2, в котором левый 3D-домен цитокина образован из части первого мономера цитокина и части второго мономера цитокина; и правый 3D-домен цитокина образован из части первого мономера цитокина и части второго мономера цитокина.

A4. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A2 или клаузуле A3, где два мостиковых линкерных пептида представляют собой структурированные линкеры, содержащие от 3 до 20 аминокислот, где мостиковые пептидные линкерные последовательности содержат 5 или менее, предпочтительно 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser.

A5. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул A1-A4, где: (a) первый и второй мономеры цитокина имеют один и тот же структурный тип; или (b) где первый и второй мономеры цитокинов относятся к разным типам.

A6. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул A1-A5, где первый домен цитокина выбран или получен из цитокина группы, состоящей из: IL-10, IL-5 и IFN γ ; и где второй домен цитокина выбран или получен из

цитокина из группы, состоящей из: IL-10, IL-5 и IFN γ .

A7. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул A1-A6, где первый мономер цитокина и второй мономер цитокина представляют собой мономеры IL-10; где необязательно IL-10 получен из последовательности человека или мыши.

A8. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул A1-A7, где первый и второй мономеры цитокина содержат последовательность ORF IL-10 (SEQ ID NO: 4), SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 349 или SEQ ID NO: 349 или SEQ ID NO: 4. ID NO: 350 или их функциональный фрагмент, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 349 или SEQ ID NO: 350 или их функциональным фрагментом.

A9. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A8, где первая и/или вторая последовательности мономера цитокина включают одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из: N18I, D28E, S31K, N45S, N92I, K99N и T155M, где нумерация мутированных положений основана на SEQ ID NO: 181, где Q в первом положении SEQ ID NO: 181 представляет собой положение последовательности Q7.

A10. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A9, где первая и/или вторая последовательности мономера цитокина включают по меньшей мере аминокислотные замены: D28E, S31K, N45S и T155M.

A11. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A9 или клаузуле A10, где первая последовательность мономера цитокина включает все аминокислотные замены: N18I, D28E, S31K, N45S, N92I, K99N и T155M; и где вторая последовательность мономера цитокина включает все аминокислотные замены: D28E, S31K, N45S, N92I, K99N и T155M.

A12. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул A1 - A8, который содержит:

(i) последовательность SEQ ID NO: 9 (MutSC1) или последовательность, имеющую с этой последовательностью по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности; или

(ii) последовательность SEQ ID NO: 11-(NtCt)-SEQ ID NO: 12 (фолдикин-10) или последовательность, имеющую с этой последовательностью по меньшей мере

80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности.

A13. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул A1-A11, который содержит последовательность SEQ ID NO: 10 (MutSC2) или последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности.

A14. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A12(ii), где линкерный пептид NtCt имеет последовательность из около 4-8 аминокислот или из около 3-6 аминокислот.

A15. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A14, где линкерный пептид NtCt содержит последовательность, выбранную из FGGLD (SEQ ID NO: 342) или NGGLD (SEQ ID NO: 318), необязательно дополнительно содержащую одну или несколько аминокислотных мутаций фланкирующие остатки линкерного пептида NtCt; и, в частности, последовательность представляет собой SEQ ID NO: 65.

A16. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул A1 - A6, где первый мономер цитокина и второй мономер цитокина представляют собой мономеры IL-5; где необязательно IL-5 представляет собой последовательность человека или мыши.

A17. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул A1 - A6 или A16, где первый и второй мономеры цитокина содержат последовательность человеческого IL-5 (SEQ ID NO: 82) или его функциональный фрагмент, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 82 или ее функциональным фрагментом.

A18. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A16 или клаузуле A17, который содержит последовательность SEQ ID NO: 101-(NtCt)-SEQ ID NO: 102 (фолдикин-5) или последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности.

A19. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A18, где линкерный пептид NtCt имеет последовательность из около 3-20 аминокислот, из около 3-16 аминокислот, из около 4-12 аминокислот, из около 4-8 аминокислот кислоты, из около 3-8 аминокислот или из около 3-6 аминокислот.

A20. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A19, где

линкерный пептид NtCt содержит последовательность, выбранную из FGGLD (SEQ ID NO: 342) или NGGLD (SEQ ID NO: 318).

A21. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клауз A1-A6, где первый мономер цитокина и второй мономер цитокина представляют собой мономеры IFN γ ; необязательно, где IFN γ представляет собой последовательность человека или мыши.

A22. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клауз A1-A6 или A21, где первый и второй мономеры цитокина содержат последовательность IFN γ человека (SEQ ID NO: 194) или его функциональный фрагмент, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 194 или ее функционального фрагмента.

A23. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A21 или клаузуле A22, который содержит последовательность SEQ ID NO: 14-(NtCt)-SEQ ID NO: 15 (фолдикин-IFNG) или последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности.

A24. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A23, где линкерный пептид NtCt имеет последовательность, состоящую из около 3-20 аминокислот, из около 3-16 аминокислот, из около 4-12 аминокислот, из около 4-8 аминокислот, из около 3-8 аминокислот или из около 3-6 аминокислот.

A25. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле A24, где линкерный пептид NtCt содержит последовательность, выбранную из FGGLD (SEQ ID NO: 342) или NGGLD (SEQ ID NO: 318).

A26. Выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид по любой из клауз A1-A25.

A27. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по клаузуле A26.

A28. Вектор по клаузуле A27, который представляет собой бактериофаговый вектор или вирусный вектор.

A29. Клетка, экспрессирующая полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клауз A1-A25.

A30. Клетка по клаузуле A29, которая является эукариотической клеткой; особенно клеткой человека.

A31. Клетка по клаузуле A29, которая представляет собой рекомбинантную бактериальную клетку; где необязательно бактериальная клетка выбрана из

бактериального штамма *Mycoplasma* (например, *M. pneumoniae*), *E. coli*, *L. Lactis*, *S. aureus*, или *B. subtilis*.

A32. Клетка по клаузуле A21, представляющая собой штамм *Mycoplasma pneumoniae*, необязательно полученная из штамма M129-B7 (ATTC 29342); *Escherichia coli* BL21; или штамм *Lactococcus lactis* NZ9000 – pepN::nisRK.

A33. Клетка, содержащая полинуклеотид или вектор по любой из клаузул A26-A28.

A34. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул A1 - A25, клетку по любой из клаузул A29 - A33 или выделенный полинуклеотид или вектор по любой из клаузул A26 - A28.

A35. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул A1 - A25, клетка по любой из клаузул A29 - A33, выделенный полинуклеотид или вектор по любой из клаузул A26 - A28 или фармацевтическая композиция по клаузуле A32 для применения в медицине.

A36. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле A35, где применение осуществляется в способе лечения заболевания или расстройства, выбранного из воспалительных заболеваний и расстройств; заболеваний легких; рака или пролиферативных заболеваний или состояний; инфекционных заболеваний; аллергии, иммунологических или аутоиммунных заболеваний и расстройств; поражения, дегенерации или повреждения тканей; и условий, связанных с этим.

A37. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле A36, где рак или пролиферативное заболевание или нарушение представляет собой солидную опухоль, например, выбранную из группы, состоящей из рака легкого (в частности, аденокарциномы легкого или плоскоклеточного рака легкого), рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака молочной железы, рака ободочной кишки, глиобластомы головного мозга, рака поджелудочной железы, острого моноцитарного лейкоза, рака почки, колоректального рака, рака кожи (например, меланомы), рака желудка, рака щитовидной железы, рака кости и рака печени.

A38. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле A36, где воспалительное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из аллергии, астмы, аутоиммунных заболеваний, целиакии, гломерулонефрита,

гепатита, воспалительного заболевания кишечника, реперфузионного повреждения, отторжения трансплантата, диабета, болезни Альцгеймера, остеоартрита, фибромиалгии, мышечной боли в пояснице, артрита, мышечной боли в шее, миокардита, анкилозирующего спондилита (АС), синдрома антифосфолипидных антител (АФС), миозита, ревматоидного артрита, склеродермии, синдрома Шёгрена, фиброза.

А39. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле А36, где состояние поражения, дегенерации или повреждения ткани выбрано из группы, состоящей из колита, заживления ран, роста волос, регенерации печени и матричного синтеза.

А40. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле А36, где применение осуществляется в иммунотерапии рака и/или при иммуноонкологическом лечении.

В1. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, содержащий: (а) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (б) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где последовательность второго домена мономера цитокина или его функциональная часть вставлена в последовательность первого домена мономера цитокина так, что первая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на N-конце второго мономера цитокина или его функциональной части, а вторая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на C-конце второго мономера цитокина или его функциональной части.

В2. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле В1, где полипептид одноцепочечного димерного цитокина имеет третичную структуру, включающую левый 3D-домен цитокина и правый 3D-домен цитокина, и при этом левый 3D-домен цитокина соединен с правым 3D-доменом цитокина с помощью двух мостиковых линкерных пептидов.

В3. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле В2, где левый 3D-цитоклиновый домен представляет собой цитоклин с расщепленным доменом, образованный из первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина или его функциональной части, а правый 3D-цитоклиновый домен представляет собой цитоклин с непрерывным доменом образованный из второго домена мономера цитокина или его функциональной части.

В4. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле В2 или

клаузуле В3, где два мостиковых линкерных пептида имеют последовательность, содержащую от около 3 до около 20 аминокислот, и где последовательности мостиковых линкерных пептидов содержат 5 или менее и, соответственно, 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; где необязательно два мостиковых линкерных пептида из структурированных линкеров.

В5. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле В4, где два мостиковых линкерных пептида имеют одинаковую последовательность или представляют собой разные последовательности.

В6. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле В2 или по любой из клаузул В3-В5, при наличии зависимости от клаузулы В2, где первый из двух мостиковых линкерных пептидов соединяет N-концевую часть первого домена мономера цитокина с N-концевой частью второго домена мономера цитокина, и второй из двух мостиковых линкерных пептидов соединяет C-концевую часть второго домена мономера цитокина с C-концом первого домена мономера цитокина.

В7. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле В2 или по любой из клаузул В3-В6, если зависит от клаузул В2, где первый домен мономера цитокина расщеплен в петлевой области между парой соседних α -спиралей, и где два мостиковых линкерных пептида соединяют второй домен мономера цитокина между соседними α -спиральями первого домена мономера цитокина; при этом необязательно первый домен цитокина расщеплен в области петли между второй и третьей α -спиральями или между третьей и четвертой α -спиральями домена мономера цитокина.

В8. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле В6 или клаузуле В7, где второй домен мономера цитокина содержит N-концевую часть и C-концевую часть, и при этом N-концевая часть соединена с C-концевой частью сконструированного пептидного линкера; где необязательно сконструированный пептидный линкер имеет последовательность, состоящую из около 3-20 аминокислот, около 3-16 аминокислот, около 4-12 аминокислот, около 4-8 аминокислот, около 3-8 аминокислот кислоты или около 3-6 аминокислот.

В9. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле В8, где сконструированный пептидный линкер содержит 5 или менее, 3 или менее или 2 или менее смежных остатков Gly и/или Ser.

В10. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле В8 или клаузуле В9, где:

(i) второй домен мономера цитокина инвертирован по сравнению с соответствующим мономером цитокина дикого типа, на котором этот домен основан, так

что N-концевая часть второго домена мономера цитокина соответствует С-концевой части соответствующей последовательности домена мономера цитокина дикого типа, а С-концевая часть второго домена мономера цитокина соответствует N-концевой части соответствующей последовательности домена мономера цитокина дикого типа; где необязательно N-концевая часть второго домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали, а С-концевая часть второго домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали; в частности, где N-концевая часть и С-концевая часть второго домена мономера цитокина имеют одинаковое количество α -спиралей; и/или

(ii) N-концевая часть первого домена мономера цитокина соответствует N-концевой части соответствующей последовательности домена мономера цитокина дикого типа, а С-концевая часть первого домена мономера цитокина соответствует С-концевой части соответствующей последовательности домена мономера цитокина дикого типа; где необязательно N-концевая часть первого домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали, а С-концевая часть первого домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали; в частности, где N-концевая часть и С-концевая часть второго домена мономера цитокина имеют одинаковое количество α -спиралей.

V11. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул V8-V10, где два мостиковых линкерных пептида соединяются со вторым мономерным доменом цитокина между парой соседних α -спиралей.

V12. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул V1-V11, где: (а) первый и второй мономеры цитокинов относятся к одному и тому же типу; или (б) где первый и второй мономеры цитокинов относятся к разным типам.

V13. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул V1-V12, где первый мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса II из группы, состоящей из: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IFN λ 2, 3 и 1 (IL-28A, IL-28B и IL-29, соответственно), интерферона IFN α I типа (IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13), IFNA14, IFNA16, IFNA17 и IFNA21), IFN ω (IFNW1), IFN ϵ (IFNE), IFN κ (IFNK) и IFN β (IFNB1); и при этом второй мономер цитокина выбран из или получен из цитокина класса I из группы, состоящей из: IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTF1, LIF, OSM, CSF3, IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, IL13, IL15, IL21, TSLP, GM-CSF, CSF1 и CSF2; необязательно, при этом первая и вторая последовательности мономеров цитокинов происходят из последовательности человека или мыши.

V14. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул V1-V13, где первый мономер цитокина и/или второй мономер цитокина представляют

собой мономеры IL-22; где необязательно IL-22 представляет собой последовательность человека или мыши.

B15. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул B1-B14, где первый и второй мономеры цитокина содержат последовательность IL-22 (SEQ ID NO: 184) или ее функциональный фрагмент, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 184 или ее функциональным фрагментом.

B16. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле B14 или по клаузуле B15, где первая и/или вторая последовательности мономера цитокина включают одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают стабильность гидрофобного ядра домена мономера IL-22; где необязательно одна или несколько аминокислотных замен выбраны из группы, состоящей из: T56L или T56M, A66M, N68Q, V95I, T99F и S173L, где нумерация мутированных положений основана на последовательности IL-22 SEQ ID NO: 184, где A в первом положении SEQ ID NO: 184 представляет собой положение последовательности A34.

B17. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле B16, где первая и/или вторая последовательности мономера цитокина включают набор аминокислотных замен, выбранных из:

- (i) A66M, V95I и T99F;
- (ii) T56L, A66M, V95I и T99F;
- (iii) T56M, A66M, N68Q, V95I и T99F
- (iii) T56L, A66M, V95I, T99F и S173L; и
- (ii) T56M, A66M, N68Q, V95I, T99F и S173L.

B18. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул B15 до B17, где первая и/или вторая последовательности мономера цитокина включают одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают стабильность и/или аффинность связывания мономерного домена IL-22 с его рецептором R1 и/или R2; где необязательно одна или несколько аминокислотных замен выбраны из группы, состоящей из: D43E, S45R, K61W, S64M, T70I, E77Y и A132Y, где нумерация мутированных положений основана на SEQ ID NO: 184, где A в первом положении SEQ ID NO: 184 представляет собой положение последовательности A34.

B19. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле B18, где первая и/или вторая последовательности мономера цитокина включают набор аминокислотных замен, выбранных из:

- (i) A132Y, D43E, S45R, E77Y, T70I;
- (ii) K61W, S64M; и
- (iii) A132Y, D43E, S45R, E77Y, T70I, K61W, S64M.

B20. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле B6 или по любой из клаузул B7-B19, при наличии зависимости от клаузулы B6, где первый из двух мостиковых линкерных пептидов содержит или имеет последовательность TCMPPGGSKT (SEQ ID NO: 337), а второй из двух мостиковых линкерных пептидов содержит или имеет последовательность RLELLP (SEQ ID NO: 331); или где первый из двух мостиковых линкерных пептидов содержит последовательность NRLKKLMASSD (SEQ ID NO: 332), а второй из двух мостиковых линкерных пептидов содержит последовательность RLELLP (SEQ ID NO: 331).

B21. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле B8 или по любой из клаузул B9-B20, если он зависит от клаузулы B8, где N-концевая часть второго домена мономера цитокина соединена с C-концевой частью второго домена мономера цитокина посредством сконструированного пептидного линкера, содержащего или имеющего последовательность ANGT (SEQ ID NO: 329).

B22. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любому из клаузул B1-B21, который содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 65 (фолдикин-22_1), 66 (фолдикин-22_3), 72 (3dlq. последовательность мономера Pdb), 73 (мономер IL-22hydC), 74 (мономер MutantC_IL22), 75 (мономер MutantD_IL22), 76 (мономер MutantE_IL22) и 143 (фолдикин-22), или последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности.

B23. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул B1-B21, который содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 65 (фолдикин-22_1), 66 (фолдикин-22_3) и 143 (фолдикин-22), или последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности.

B24. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул B1-B13, который содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 141, 142, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152 и 153, или последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности

последовательности.

В25. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул В22-В24, где линкерный пептид NtCt имеет последовательность, состоящую из около 3-20 аминокислот, из около 3-16 аминокислот, из около 4-12 аминокислот, из около 4-8 аминокислот, из около 3-8 аминокислот или из около 3-6 аминокислот.

В26. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле В25, где линкерный пептид NtCt содержит последовательность, выбранную из FGGLD (SEQ ID NO: 342), NGGLD (SEQ ID NO: 318), NFGGLDY (SEQ ID NO: 316) или ANGT (SEQ ID NO: 316) или ANGT (SEQ ID NO: 329); в частности, ID последовательности SEQ ID NO: 190.

В27. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул В22-В26, если зависит от пункта В6, где каждый из мостиковых линкерных пептидов (X_n) имеет последовательность, состоящую из около 3-20 аминокислот, из около 3-16 аминокислот, из около 4-12 аминокислот, из около 4-8 аминокислот, из около 3-8 аминокислот или из около 3-6 аминокислот.

В28. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле В27, где мостиковые линкерные пептиды (X_n) имеют последовательность, выбранную из TCMPPGGSKT (SEQ ID NO: 337), RLELLP (SEQ ID NO: 331); и NRLKKLMASDD (SEQ ID NO: 332).

В29. Выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид по любой из клаузул В1-В28.

В30. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по клаузуле В29.

В31. Вектор по клаузуле В30, который представляет собой бактериофаговый вектор или вирусный вектор.

В32. Клетка, экспрессирующая полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул В1-В28.

В33. Клетка по клаузуле В32, которая является эукариотической клеткой; особенно клеткой человека.

В34. Клетка по клаузуле В32, которая представляет собой рекомбинантную бактериальную клетку; где необязательно бактериальная клетка выбрана из бактериального штамма *Mycoplasma* (например, *M. pneumoniae*), *E. coli*, *L. lactis*, *S. aureus* или *B. subtilis*.

В35. Клетка по клаузуле В34, которая представляет собой штамм *Mycoplasma pneumoniae*, необязательно полученный из штамма M129-B7 (ATTC 29342); *Escherichia coli* BL21; или штамм *Lactococcus lactis* NZ9000 – pepN::nisRK.

В36. Клетка, содержащая полинуклеотид или вектор по любой из клаузул В29-В31.

В37. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул В1-В28, клетку по любой из клаузул В32-В36 или выделенный полинуклеотид или вектор по любой из клаузул В29-В31.

В38. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул В1-В28, клетка по любой из клаузул В32-В36, выделенный полинуклеотид или вектор по любой из клаузул В29-В31 или фармацевтическая композиция по клаузуле В35 для применения в медицине.

В39. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле В38, где применение осуществляется в способе лечения заболевания или расстройства, выбранного из воспалительных заболеваний и расстройств; заболеваний легких; рака или пролиферативных заболеваний или состояний; инфекционных заболеваний; аллергии, иммунологических или аутоиммунных заболеваний и расстройств; поражения, дегенерации или повреждения тканей; и условий, связанных с этим.

В40. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле В39, где рак или пролиферативное заболевание или нарушение представляет собой солидную опухоль, например, выбранную из группы, состоящей из рака легкого (в частности, аденокарциномы легкого или плоскоклеточного рака легкого), рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака молочной железы, рака ободочной кишки, глиобластомы головного мозга, рака поджелудочной железы, острого моноцитарного лейкоза, рака почки, колоректального рака, рака кожи (например, меланомы), рака желудка, рака щитовидной железы, рака кости и рака печени.

В41. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле В39, где воспалительное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из аллергии, астмы, аутоиммунных заболеваний, целиакии, гломерулонефрита, гепатита, воспалительного заболевания кишечника, реперфузионного повреждения, отторжения трансплантата, диабета, болезни Альцгеймера, остеоартрита, фибромиалгии, мышечной боли в пояснице, артрита, мышечной боли в шее, миокардита, анкилозирующего спондилита (АС), синдрома антифосфолипидных антител (АФС), миозита, ревматоидного артрита, склеродермии, синдрома Шёгрена, фиброза.

В42. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле В39, где состояние поражения, дегенерации или повреждения ткани выбрано из группы, состоящей из колита, заживления ран, роста волос, регенерации печени и матричного синтеза.

Б43. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле В39, где применение осуществляется в иммунотерапии орака и/или при иммуноонкологическом лечении.

С1. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, содержащий: (а) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где последовательность второго домена мономера цитокина или его функциональная часть вставлена в последовательность первого домена мономера цитокина так, что первая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на N-конце второго мономера цитокина или его функциональной части, а вторая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на C-конце второго мономера цитокина или его функциональной части.

С1А. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле С1, где первая часть последовательности первого домена мономера цитокина соответствует C-концевой части мономера природного цитокина, а вторая часть последовательности первого домена мономера цитокина соответствует N-концевой части мономера природного цитокина.

С2. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле С1 или клаузуле С1А, отличающийся тем, что полипептид одноцепочечного димерного цитокина имеет третичную структуру, включающую левый 3D-домен цитокина и правый 3D-домен цитокина, и при этом левый 3D-домен цитокина соединен с правым 3D-доменом цитокина двумя мостиковыми линкерными пептидами.

С3. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле С2, где левый 3D-домен цитокина представляет собой цитокин с расщепленным доменом, образованный из первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина или его функциональной части, а правый 3D-цитоклиновый домен представляет собой цитокин с непрерывным доменом образован из второго домена мономера цитокина или его функциональной части.

С4. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле С2 или

клаузуле С3, где два мостиковых линкерных пептида имеют последовательность из около 3-20 аминокислот, из около 3-16 аминокислот, из около 4-12 аминокислот, из около 4-8 аминокислот, из около 3-8 аминокислот или из около 3-6 аминокислот; и где последовательности мостикового линкера содержат 5 или менее, а предпочтительно 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; где необязательно два мостиковых линкерных пептида представляют собой структурированные линкеры.

С5. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле С4, где два мостиковых линкерных пептида имеют одинаковую последовательность или разные последовательности.

С6. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле С4 или клаузуле С5, где два мостиковых линкера представляют собой структурированные линкеры или короткие гибкие линкеры.

С7. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле С2 или по любой из клаузул С3-С6, при наличии зависимости от клаузулы С2, где первый из двух мостиковых линкерных пептидов соединяет первую часть последовательности первого домена мономера цитокина с N-концом второго домена мономера цитокина, а второй из двух мостиковых линкерных пептидов соединяют С-конец второго домена мономера цитокина со второй частью последовательности первого домена мономера цитокина.

С8. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул С1-С7, где первый домен мономера цитокина расщеплен в петлевой области между парой соседних α -спиралей с образованием N- и С-концов полипептида одноцепочечного димерного цитокина.

С9. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул С1-С8, где первый домен мономера цитокина инвертирован по сравнению с соответствующим мономером цитокина дикого типа, на котором домен основан, так что N-концевая часть первого домена мономера цитокина соответствует С-концевой части соответствующей последовательности домена мономера цитокина дикого типа, а С-концевая часть первого домена мономера цитокина соответствует N-концевой части соответствующей последовательности домена мономера цитокина дикого типа.

С10. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле С8 или клаузуле С9, где N-концевая часть первого домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали, а С-концевая часть первого домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали; в частности, где N-концевая часть и С-концевая часть первого домена мономера цитокина имеют одинаковое количество α -спиралей; при этом необязательно первый домен цитокина расщеплен в области петли между второй и третьей α -

спиралями или между третьей и четвертой α -спиралями домена мономера цитокина.

C11. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул C1-C10, где пептидный линкер/петля между двумя соседними α -спиралями второго домена мономера цитокина заменены сконструированным линкерным пептидом, состоящим из около 3-20 аминокислот, из около 3-16 аминокислот, из около 4-12 аминокислот, из около 4-8 аминокислот, из около 3-8 аминокислот или из около 3-6 аминокислот.

C11A. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул C1-C11, где последовательность сконструированного пептидного линкера содержит 5 или менее, предпочтительно 3 или менее или 2 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; где необязательно сконструированный пептидный линкер представляет собой структурированный линкер.

C12. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул C1-C11, где: (i) первый и второй мономеры цитокина относятся к одному и тому же типу; или

(ii) первый и второй мономеры цитокинов относятся к разным типам.

C13. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул C1-C12, где (i) первый мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса I из группы, состоящей из: IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, IL15, IL21, GMCS-F, IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTF1, LIF, OSM и CSF3; и где второй мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса I группы, состоящей из: IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, IL15, IL21, GMCS-F, IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTF1, LIF, OSM и CSF3;

(ii) первый мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса I группы, состоящей из: IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTF1, LIF, OSM и CSF3; и где второй мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса I группы, состоящей из: IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTF1, LIF, OSM и CSF3; или

(iii) первый мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса I из группы, состоящей из: IL2, IL3, IL4, IL7, IL9, IL15, IL21, TSL и GMCS-F; и где второй мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса I из группы, состоящей из: IL2, IL3, IL4, IL7, IL9, IL15, IL21, TSL и GMCS-F; необязательно, при этом первая и вторая последовательности мономеров цитокина происходят из последовательности человека или мыши.

C14. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул

C1-C13, который содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100 и 101, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 и 125, или последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности.

C15. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле C13 или клаузуле C14, где каждый из мостиковых линкерных пептидов (X_n) имеет последовательность, состоящую из около 3-20 аминокислот, из около 3-16 аминокислот, из около 4-12 аминокислот, из около 4-8 аминокислот, из около 3-8 аминокислот или из около 3-6 аминокислот.

C16. Выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид по любой из клаузул C1-C15.

C17. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по клаузуле C16.

C18. Вектор по клаузуле C17, который представляет собой бактериофаговый вектор или вирусный вектор.

C19. Клетка, экспрессирующая полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул C1-C15.

C20. Клетка по клаузуле C19, которая является эукариотической клеткой; особенно клеткой человека.

C21. Клетка по клаузуле C19, которая представляет собой рекомбинантную бактериальную клетку; где необязательно бактериальная клетка выбрана из бактериального штамма *Mycoplasma* (например, *M. pneumoniae*), *E. coli*, *L. lactis*, *S. aureus* или *B. subtilis*.

C22. Клетка по клаузуле C21, представляющая собой штамм *Mycoplasma pneumoniae*, необязательно полученная из штамма M129-B7 (ATTC 29342); *Escherichia coli* BL21; или штамм *Lactococcus lactis* NZ9000 – pepN::nisRK.

C23. Клетка, содержащая полинуклеотид или вектор по любой из клаузул C16-C18.

C24. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул C1-C15, клетку по любой из клаузул C19-C23 или выделенный полинуклеотид или вектор по любой из клаузул C16-C18.

C25. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул C1-C15, клетка по любой из клаузул C19-C23, выделенный полинуклеотид или вектор по любой из клаузул C16-C18 или фармацевтическая композиция по клаузуле C24 для

применения в медицине.

C26. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле C25, где применение осуществляется в способе лечения заболевания или расстройства, выбранного из воспалительных заболеваний и расстройств; заболеваний легких; рака или пролиферативных заболеваний или состояний; инфекционных заболеваний; аллергии, иммунологических или аутоиммунных заболеваний и расстройств; поражения, дегенерации или повреждения тканей; и условий, связанных с этим.

C27. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле C36, где рак или пролиферативное заболевание или нарушение представляет собой солидную опухоль, например, выбранную из группы, состоящей из рака легкого (в частности, аденокарциномы легкого или плоскоклеточного рака легкого), рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака молочной железы, рака ободочной кишки, глиобластомы головного мозга, рака поджелудочной железы, острого моноцитарного лейкоза, рака почки, колоректального рака, рака кожи (например, меланомы), рака желудка, рака щитовидной железы, рака кости и рака печени.

C28. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле C26, где воспалительное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из аллергии, астмы, аутоиммунных заболеваний, целиакии, гломерулонефрита, гепатита, воспалительного заболевания кишечника, преперфузионного повреждения, отторжения трансплантата, диабета, болезни Альцгеймера, остеоартрита, фибромиалгии, мышечной боли в пояснице, артрита, мышечной боли в шее, миокардита, анкилозирующего спондилита (АС), синдрома антифосфолипидных антител (АФС), миозита, ревматоидного артрита, склеродермии, синдрома Шёгрена, фиброза.

C29. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле C26, где состояние поражения, дегенерации или повреждения ткани выбрано из группы, состоящей из колита, заживления ран, роста волос, регенерации печени и матричного синтеза.

C30. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле C26, где применение осуществляется в иммунотерапии рака и/или при иммуноонкологическом лечении.

D1. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, содержащий: (a) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где первая последовательность домена мономера цитокина получена из типа цитокина, отличного от последовательности второго домена мономера цитокина; и где левый цитокиновый домен представляет собой цитокин с расщепленным доменом, образованный из первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина или его функциональной части, а правый 3D-домен цитокина представляет собой цитокин с непрерывным доменом, образованный из второго домена мономера цитокина или его функциональной части.

D2. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле D1, где полипептид одноцепочечного димерного цитокина имеет третичную структуру, включающую левый 3D-домен цитокина, образованный из первого домена мономера цитокина или его функциональной части, и правый 3D-домен цитокина, образованный из второго цитокиновый мономерный домен или его функциональной части.

D3. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле D1 или клаузуле D2, где первый домен мономера цитокина соединен со вторым доменом мономерного цитокина двумя мостиковыми линкерными пептидами.

D4. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле D3, где каждый из двух мостиковых линкерных пептидов имеет последовательность, состоящую из около 3-20 аминокислот, около 3-16 аминокислот, около 4-12 аминокислот, из около 4-8 аминокислот, из около 3-8 аминокислот или из около 3-6 аминокислот; предпочтительно, чтобы мостиковые пептидные линкерные последовательности содержали 5 или менее, 3 или менее или 2 или менее смежных остатков Gly и/или Ser.

D5. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул D1-D4, где второй домен мономера цитокина или его функциональная часть вставлены в последовательность первого домена мономера цитокина таким образом, что первая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на N-конце второго мономера цитокина или его функциональной части, а вторая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на C-конце второго мономера цитокина или его функциональной части.

D6. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле D2 или любой из клаузул D3-D5, при наличии зависимости от клаузулы D2, где два мостиковых линкерных пептида имеют одинаковую последовательность или представляют собой разные последовательности.

D7. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле D2 или

по любой из клаузул D3-D6, при наличии зависимости от клаузулы D2, где первый из двух мостиковых линкерных пептидов соединяет N-концевую часть первого домена мономера цитокина с N-концом второго домена мономера цитокина и второй из двух мостиковых линкерных пептидов соединяют C-конец второго домена мономера цитокина с N-концевой частью первого домена мономера цитокина.

D8. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул D1-D7, где:

(i) первый домен мономера цитокина происходит из цитокина класса II, а второй мономер цитокина происходит из цитокина класса I; или

(ii) первый домен мономера цитокина происходит из цитокина класса I, а второй мономер цитокина происходит из цитокина класса II.

D9. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле D8(i), где первый домен мономера цитокина расщеплен в петлевой области между парой соседних α -спиралей, и где два мостиковых линкерных пептида соединяют второй домен мономера цитокина между соседними α -спиралями первого домена мономера цитокина; при этом необязательно первый мономер цитокина расщеплен в области петли между второй и третьей α -спиралями или между третьей и четвертой α -спиралями домена мономера цитокина.

D10. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле D8(ii), где первый мономер цитокина расщеплен в петлевой области между парой соседних α -спиралей с образованием N- и C-концов одноцепочечного димерного цитокина, а два мостиковых линкерных пептида соединяют исходные C- и N-концы первого мономера цитокина с исходными N- и C-концами, соответственно, второго домена мономера цитокина с образованием одноцепочечного димерного цитокина.

D11. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле D10, где первый мономер цитокина расщеплен в области петли между второй и третьей α -спиралью или между третьей и четвертой α -спиралью домена мономера цитокина.

D12. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул D8(ii), D10 или D11, где расщепленные части или первый домен мономера цитокина инвертированы по сравнению с соответствующим мономером цитокина дикого типа, на котором этот домен основан, так что N-концевая часть первого домена мономера цитокина соответствует C-концевой части соответствующей последовательности домена мономера цитокина дикого типа, а C-концевая часть первого домена мономера цитокина соответствует N-концевой части последовательности соответствующего домена мономера цитокина дикого типа; где необязательно N-концевая часть первого домена мономера

цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали, а С-концевая часть второго домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали; в частности, где N-концевая часть и С-концевая часть первого домена мономера цитокина имеют одинаковое количество α -спиралей.

D13. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле D8(ii), где второй домен мономера цитокина содержит N-концевую часть и С-концевую часть, и где N-концевая часть соединена с С-концевой частью сконструированным пептидным линкером; где необязательно сконструированный линкер имеет последовательность из от около 3 до около 20 аминокислот, из около 3-16 аминокислот, из около 4-12 аминокислот, из около 4-8 аминокислот, из около 3-8 аминокислот или из около 3-6 аминокислот.

D14. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле D13, где второй домен мономера цитокина инвертирован по сравнению с соответствующим мономером цитокина дикого типа, на котором этот домен основан, так что N-концевая часть второго домена мономера цитокина соответствует С-концевой части соответствующей последовательности домена мономера цитокина дикого типа, а С-концевая часть второго домена мономера цитокина соответствует N-концевой части соответствующей последовательности домена мономера цитокина дикого типа; где необязательно N-концевая часть второго домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали, а С-концевая часть второго домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали; в частности, где N-концевая часть и С-концевая часть второго домена мономера цитокина имеют одинаковое количество α -спиралей.

D15. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул D8(ii), D13 или D14, где первый мономер цитокина расщеплен в петлевой области между парой соседних α -спиралей с образованием N- и С-концов одноцепочечного димерного цитокина; при этом необязательно первый мономер цитокина расщеплен в петлевой области между второй и третьей α -спиралями или между третьей и четвертой α -спиралями домена мономера цитокина.

D16. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул D8(ii) или D13-D15, где второй мономер цитокина расщеплен в петлевой области между парой соседних α -спиралей, и где два мостиковых линкерных пептида соединяют исходные С- и N-концы первого мономера цитокина, соответственно между соседними α -спиралями второго домена мономера цитокина; необязательно, при этом второй мономер цитокина расщеплен в области петли между второй и третьей α -спиралями или между третьей и четвертой α -спиралями домена мономера цитокина.

D17. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул D1-D16, где:

(i) первый мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса II группы, состоящей из: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IFN λ 2, 3 и 1 (IL-28A, IL-28B и IL-29, соответственно), интерферона IFN α I типа (IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17 и IFNA21), IFN ω (IFNW1), IFN ϵ (IFNE), IFN κ (IFNK) и IFN β (IFNB1); и при этом второй мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса I из группы, состоящей из: IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, IL15, IL21, GMCS-F, IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTF1, LIF, OSM и CSF3; или

(ii) первый мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса I из группы, состоящей из: IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, IL15, IL21, GMCS-F, IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTF1, LIF, OSM и CSF3; и где второй мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса II группы, состоящей из: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IFN λ 2, 3 и 1 (IL-28A, IL-28B и IL-29, соответственно), интерферона IFN α I типа (IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17 и IFNA21), IFN ω (IFNW1)), IFN ϵ (IFNE), IFN κ (IFNK) и IFN β (IFNB1).

D18. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле D9, который содержит последовательность SEQ ID NO: 267-(Xn)-SEQ ID NO: 268-(Xn)-SEQ ID NO: 269 (фолдикин 22-2_6B) или последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности.

D19. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул D13-D16, который содержит последовательность SEQ ID NO: 263-(Xn)-SEQ ID NO: 264-(NtCt)-SEQ ID NO: 265-(Xn)-SEQ ID NO: 266 (фолдикин 2-22_6B) или последовательность, имеющая с ней по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности.

D20. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле D9, который содержит последовательность SEQ ID NO: 260-(Xn)-SEQ ID NO: 261-(Xn)-SEQ ID NO: 262 (фолдикин 2-22_6B) или последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности.

D21. Выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид по любой из клаузл D1-D20.

D22. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по клаузуле D21.

D23. Вектор по клаузуле D22, который представляет собой бактериофаговый вектор или вирусный вектор.

D24. Клетка, экспрессирующая полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул D1-D20.

D25. Клетка по клаузуле D42, которая является эукариотической клеткой; особенно клеткой человека.

D26. Клетка по клаузуле D24, которая представляет собой рекомбинантную бактериальную клетку; где необязательно бактериальная клетка выбрана из бактериального штамма *Mycoplasma* (например, *M. pneumoniae*), *E. coli*, *L. lactis*, *S. aureus* или *B. subtilis*.

D27. Клетка по клаузуле D26, которая представляет собой штамм *Mycoplasma pneumoniae*, необязательно полученный из штамма M129-B7 (ATTC 29342); *Escherichia coli* BL21; или штамма *Lactococcus lactis* NZ9000 – pepN::nisRK.

D28. Клетка, содержащая полинуклеотид или вектор по любой из клаузул D21-D23.

D29. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул D1-D20, клетку по любой из клаузул D24-D28 или выделенный полинуклеотид или вектор по любой из клаузул D21-D23.

D30. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул D1-D20, клетка по любой из клаузул D24-D28, выделенный полинуклеотид или вектор по любой из клаузул D21-D23 или фармацевтическая композиция по клаузуле D29 для применения в медицине.

D31. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле D30, где применение осуществляется в способе лечения заболевания или расстройства, выбранного из воспалительных заболеваний и расстройств; заболеваний легких; рака или пролиферативных заболеваний или состояний; инфекционных заболеваний; аллергии, иммунологических или аутоиммунных заболеваний и расстройств; поражения, дегенерации или повреждения тканей; и условий, связанных с этим.

D32. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле D31, где рака или пролиферативное заболевание или нарушение представляет собой солидную опухоль, например, выбранную из группы, состоящей из рака легкого (в частности, аденокарциномы легкого или плоскоклеточного рака легкого), рака мочевого

пузыря, рака шейки матки, рака молочной железы, рака ободочной кишки, глиобластомы головного мозга, рака поджелудочной железы, острого моноцитарного лейкоза, рака почки, колоректального рака, рака кожи (например, меланомы), рака желудка, рака щитовидной железы, рака кости и рака печени.

D33. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле D31, где воспалительное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из аллергии, астмы, аутоиммунных заболеваний, целиакии, гломерулонефрита, гепатита, воспалительного заболевания кишечника, преперфузионного повреждения, отторжения трансплантата, диабета, болезни Альцгеймера, остеоартрита, фибромиалгии, мышечной боли в пояснице, артрита, мышечной боли в шее, миокардита, анкилозирующего спондилита (АС), синдрома антифосфолипидных антител (АФС), миозита, ревматоидного артрита, склеродермии, синдрома Шёгрена, фиброза.

D34. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с пунктом D31, где состояние поражения, дегенерации или повреждения ткани выбрано из группы, состоящей из колита, заживления ран, роста волос, регенерации печени и матричного синтеза.

D35. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле D31, где применение осуществляется в иммунотерапии рака и/или при иммуноонкологическом лечении.

E1. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, содержащий: (a) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где первая последовательность домена мономера цитокина получена из типа цитокина, отличного от последовательности второго домена мономера цитокина; и при этом полипептид одноцепочечного димера цитокина имеет третичную структуру, включающую левый 3D-цитоклиновый домен, образованный из первого домена мономера цитокина или его функциональной части, и правый 3D-цитоклиновый домен, образованный из второго домена мономера цитокина или его функциональной части.

E2. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E1, где:

(i) первая последовательность домена мономера цитокина получена из последовательности цитокина IL-10 или IFN γ , а вторая последовательность домена мономера цитокина получена из последовательности цитокина класса I или класса II; или

(ii) первая последовательность домена мономера цитокина получена из последовательности цитокина класса I или класса II, а вторая последовательность домена мономера цитокина получена из последовательности цитокина IL-10 или IFN γ .

Е3. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E1 или клаузуле E2, где левый 3D-цитокиновый домен соединен с правым 3D-цитокиновым доменом двумя мостиковыми линкерными пептидами.

Е4. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E3, где каждый из двух мостиковых линкерных пептидов имеет последовательность, состоящую из около 3-20 аминокислот, около 3-16 аминокислот, около 4-12 аминокислот, около 4-8 аминокислот, около 3-8 аминокислот или около 3-6 аминокислот; предпочтительно, чтобы мостиковые пептидные линкерные последовательности содержали 5 или менее, 3 или менее или 2 или менее смежных остатков Gly и/или Ser.

Е5. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E1-E4, где второй домен мономера цитокина или его функциональная часть вставлены в последовательность первого домена мономера цитокина таким образом, что первая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на N-конец второго мономера цитокина или его функциональной части, а вторая часть последовательности первого мономера цитокина расположена на C-конец второго мономера цитокина или его функциональной части.

Е6. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E1-E5, где левый 3D-цитокиновый домен представляет собой цитокин с расщепленным доменом, образованный из первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина или его функциональной части, а правый 3D-цитокиновый домен представляет собой цитокин с непрерывным доменом, образованный из второго домена мономера цитокина или его функциональной части.

Е7. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E3 или по любой из клаузул E4-E6, при наличии зависимости от клаузулы E3, где два мостиковых линкерных пептида имеют одинаковую последовательность или представляют собой разные последовательности.

Е8. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E3 или по любой из клаузул E4-E7, при наличии зависимости от клаузулы E3, где первый из двух мостиковых линкерных пептидов соединяет N-концевую часть первого домена мономера цитокина с N-концевой частью второго домена мономера цитокина, и второй из двух мостиковых линкерных пептидов соединяет C-конец второго домена мономера цитокина с C-концевой частью первого домена мономера цитокина.

Е8А. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле Е8, где N-концевая часть второго домена мономера цитокина соответствует С-концевой части мономера природного цитокина, а С-концевая часть второго домена мономера цитокина соответствует N-концевой части мономера природного цитокина,

Е9. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул Е1-Е8, где:

(i) первый домен мономера цитокина происходит из цитокина IL-10, а второй домен цитокина происходит из цитокина класса I;

(ii) первый домен мономера цитокина происходит из цитокина IL-10, а второй домен цитокина происходит из цитокина класса II;

(iii) первый домен мономера цитокина происходит из цитокина $IFN\gamma$, а второй домен цитокина происходит из цитокина класса I; или

(iv) первый домен мономера цитокина происходит из цитокина $IFN\gamma$, а второй домен цитокина происходит из цитокина класса II.

Е10. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле Е6 или по любой из клаузул Е7-Е9, при наличии зависимости от клаузулы Е6, где первый домен цитокина расщеплен в петлевой области между парой соседних α -спиралей и где два мостиковых линкерных пептида соединяются второй домен мономера цитокина между соседними α -спиралями первого домена мономера цитокина; при этом необязательно первый домен цитокина расщеплен в области петли между второй и третьей α -спиралями или между третьей и четвертой α -спиралями домена мономера цитокина.

Е11. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле Е6 или по любой из клаузул Е7-Е9, при наличии зависимости от клаузулы Е6, где первый домен цитокина расщеплен в петлевой области между парой соседних α -спиралей с образованием N- и С-концов одноцепочечного димерного цитокина, а два мостиковых линкерных пептида соединяют исходные С- и N-концы первого мономера цитокина с исходными N- и С-концами, соответственно, второго домена мономера цитокина, образуя одноцепочечный димерный цитокин.

Е12. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле Е11, где первый домен цитокина расщеплен в области петли между второй и третьей α -спиралью или между третьей и четвертой α -спиралью домена мономера цитокина.

Е13. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле Е6 или по любой из клаузул Е7-Е12, при наличии зависимости от клаузулы Е6, где расщепленные части или первый домен мономера цитокина инвертированы по сравнению с

соответствующим мономером цитокина дикого типа, на котором они основаны, так что N-концевая часть первого домена мономера цитокина соответствует С-концевой части соответствующей последовательности домена мономера цитокина дикого типа, а С-концевая часть первого домена мономера цитокина соответствует N-концевой части последовательности соответствующего домена мономера цитокина дикого типа; где необязательно N-концевая часть первого домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали, а С-концевая часть второго домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали; в частности, где N-концевая часть и С-концевая часть первого домена мономера цитокина имеют одинаковое количество α -спиралей.

Е14. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле Е6 или по любой из клаузул Е7-Е13, при наличии зависимости от клаузулы Е6, где второй домен мономера цитокина содержит N-концевую часть и С-концевую часть, и при этом N-концевая часть соединена к С-концевой части с помощью сконструированного пептидного линкера; где необязательно сконструированный линкер имеет последовательность, состоящую из около 3-20 аминокислот, около 3-16 аминокислот, около 4-12 аминокислот, около 4-8 аминокислот, около 3-8 аминокислот кислоты или около 3-6 аминокислот.

Е15. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле Е14, где второй домен мономера цитокина инвертирован по сравнению с соответствующим мономером цитокина дикого типа, на котором этот домен основан, так что N-концевая часть второго домена мономера цитокина соответствует С-концевой части соответствующей последовательности домена мономера цитокина дикого типа, а С-концевая часть второго домена мономера цитокина соответствует N-концевой части соответствующей последовательности домена мономера цитокина дикого типа; где необязательно N-концевая часть второго домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали, а С-концевая часть второго домена мономера цитокина содержит 2, 3 или 4 α -спирали; в частности, где N-концевая часть и С-концевая часть второго домена мономера цитокина имеют одинаковое количество α -спиралей.

Е16. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле Е6 или по любой из клаузул Е7-Е15, при наличии зависимости от клаузулы Е6, где первый мономер цитокина расщеплен в петлевой области между парой соседних α -спиралей с образованием N- и С-концов одноцепочечный димерный цитокин; при этом необязательно первый мономер цитокина расщеплен в петлевой области между второй и третьей α -спиралями или между третьей и четвертой α -спиралями домена мономера цитокина.

Е17. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул Е14-Е16, где второй мономер цитокина расщеплен в петлевой области между парой

соседних α -спиралей, и где два мостиковых линкерных пептида соединяют исходные С- и N-концы первого мономера цитокина, соответственно между соседними α -спиралями второго домена мономера цитокина; необязательно, при этом второй мономер цитокина расщеплен в области петли между второй и третьей α -спиралями или между третьей и четвертой α -спиралями домена мономера цитокина.

E18. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E1-E17, где:

(i) цитокин класса I выбран и/или получен из цитокина группы, состоящей из: IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, IL15, IL21, GMCS-F, IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTF1, LIF, OSM и CSF3; или

(ii) цитокин класса II выбран и/или получен из цитокина группы, состоящей из: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IFN λ 2, 3 и 1 (IL-28A, IL-28B и IL-29, соответственно), интерферона IFN α I типа (IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17 и IFNA21), IFN ω (IFNW1), IFN ϵ (IFNE), IFN κ (IFNK) и IFN β (IFNB1).

E19. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E1-E18, где:

(i) первый мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса II группы, состоящей из: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IFN λ 2, 3 и 1 (IL-28A, IL-28B и IL-29, соответственно), интерферона IFN α I типа (IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17 и IFNA21), IFN ω (IFNW1), IFN ϵ (IFNE), IFN κ (IFNK) и IFN β (IFNB1); и где второй мономер цитокина выбран из цитокина с обмениваемым доменом или получен из цитокина с обмениваемым доменом из группы, состоящей из: IL-10 и IFN γ ; или

(ii) первый мономер цитокина выбран из цитокина с обмениваемым доменом или получен из цитокина с обмениваемым доменом из группы, состоящей из: IL-10 и IFN γ ; и где второй мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса II группы, состоящей из: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IFN λ 2, 3 и 1 (IL-28A, IL-28B и IL-29, соответственно), интерферона IFN α I типа (IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17 и IFNA21), IFN ω (IFNW1), IFN ϵ (IFNE), IFN κ (IFNK) и IFN β (IFNB1).

E20. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E1-E18, где:

(i) первый мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса I группы, состоящей из: IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTF1, LIF,

OSM и CSF3; и где второй мономер цитокина выбран из цитокина с обменяваемым доменом или получен из цитокина с обменяваемым доменом из группы, состоящей из: IL-10 и IFN γ ; или

(ii) первый мономер цитокина выбран из цитокина с обменяваемым доменом или получен из цитокина с обменяваемым доменом из группы, состоящей из: IL-10 и IFN γ ; и где второй мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса I группы, состоящей из: IL6, IL11, IL12A, IL23A, IL27A, IL31, CLCF1, CNTF, CTGF1, LIF, OSM и CSF3.

E21. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E1-E18, где:

(i) первый мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса I из группы, состоящей из: IL2, IL3, IL4, IL7, IL9, IL15, IL21 и GMCS-F; и где второй мономер цитокина выбран из цитокина с обменяваемым доменом или получен из цитокина с обменяваемым доменом из группы, состоящей из: IL-10 и IFN γ ; или

(ii) первый мономер цитокина выбран из цитокина с обменяваемым доменом или получен из цитокина с обменяваемым доменом из группы, состоящей из: IL-10 и IFN γ ; и где второй мономер цитокина выбран или получен из цитокина класса I из группы, состоящей из: IL2, IL3, IL4, IL7, IL9, IL15, IL21 и GMCS-F.

E22. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E1-E19, где первый мономер цитокина представляет собой IL-22, а второй мономер цитокина представляет собой IL-10; где необязательно IL-22 и IL-10 происходят из последовательности человека или мыши.

E23. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E1-E19, где первый мономер цитокина представляет собой IL-10, а второй мономер цитокина представляет собой IL-22; где необязательно IL-22 и IL-10 происходят из последовательности человека или мыши.

E24. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E1-E19 или E23, где первый мономер цитокина содержит последовательность ORF IL-10 (SEQ ID NO: 4), SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 349 или SEQ ID NO: 350 или его функциональный фрагмент, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 349 или SEQ ID NO: 350 или их функциональным фрагментом; и где второй мономер цитокина содержит последовательность IL-22 (SEQ ID NO: 184) или ее функциональный фрагмент, или последовательность, имеющую по

меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 184 или ее функциональным фрагментом.

E25. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E24, где последовательность мономера цитокина IL-22 включает одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают стабильность гидрофобного ядра домена мономера IL-22; где необязательно одна или несколько аминокислотных замен выбраны из группы, состоящей из: T56L или T56M, A66M, N68Q, V95I, T99F и S317L, где нумерация мутированных положений основана на последовательности IL-22 с SEQ ID NO: 184, где A в первом положении SEQ ID NO: 184 представляет собой положение последовательности A34.

E26. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E25, где последовательность мономера цитокина IL-22 включает набор аминокислотных замен, выбранных из:

- (i) T56L, A66M, V95I, T99F и S173L; и
- (ii) T56M, A66M, N68Q, V95I, T99F и S173L.

E27. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E24-E26, где последовательность мономера цитокина IL-22 включает одну или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают стабильность и/или аффинность связывания домена мономера IL-22 с его рецептором R1 и/или или R2; где необязательно одна или несколько аминокислотных замен выбраны из группы, состоящей из: D43E, S45R, K61W, S64M, T70I, E77Y и A132Y, где нумерация мутированных положений основана на SEQ ID NO: 129, где A в первом положении SEQ ID NO: 184 представляет собой положение последовательности A34.

E28. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E27, где последовательность мономера цитокина IL-22 включает набор аминокислотных замен, выбранных из:

- (i) A132Y, D43E, S45R, E77Y, T70I;
- (ii) K61W, S64M; и
- (iii) A132Y, D43E, S45R, E77Y, T70I, K61W, S64M.

E29. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E1-E19 или E22, где второй мономер цитокина содержит последовательность ORF IL-10 (SEQ ID NO: 4), SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 349 или SEQ ID NO: 349 или SEQ ID NO: 4. ID NO: 350 или его функциональный фрагмент, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 349 или SEQ ID NO: 350 или их функциональным фрагментом; и при этом первый мономер цитокина содержит последовательность IL-22 (SEQ ID NO: 184) или ее функциональный фрагмент, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 184 или ее функциональным фрагментом.

E30. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E29, где последовательность мономера цитокина IL-22 включает одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают стабильность расщепленного 3D-домена мономера IL-22; при этом необязательно одна или несколько аминокислотных замен выбраны из группы, состоящей из: T17L, A27M, V56I, T60F и S314L, где нумерация мутированных положений основана на последовательности фолдикина1022_3 с SEQ ID NO: 75.

E31. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E30, где последовательность мономера цитокина IL-22 включает все аминокислотные замены: T17L, A27M, V56I, T60F и S314L.

E32. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E24 или по любой из клаузул E25-E28, при наличии зависимости от клаузулы E24, или полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E29, или клаузуле E30, или клаузуле E31, при наличии зависимости от клаузулы E29, где IL-10 последовательность мономера цитокина включает одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из: N18I, D28E, S31K, N45S, N92I, K99N и T155M, где нумерация мутированных положений основана на SEQ ID NO: 181, где Q в первом положении SEQ ID NO: 181 представляет собой положение последовательности Q7.

E33. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E32, где последовательность мономера цитокина IL-10 включает по меньшей мере аминокислотные замены: D28E, S31K, N45S и T155M.

E34. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E32 или клаузуле 33, где последовательность мономера цитокина IL-10 включает все аминокислотные замены: D28E, S31K, N45S, N92I, K99N и T155M.

E35. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле E29 или по любой из клаузул E30-E34, при наличии зависимости от клаузулы E29, где N-концевая часть расщепленного 3D-домена мономера IL-22 соединена с N-концом непрерывного 3D-

домена мономера IL-10 посредством мостикового линкерного пептида, содержащего или имеющего последовательность DPKAAFKS (SEQ ID NO: 314), а С-конец непрерывного 3D-домена мономера IL-10 соединен с С-концевой частью расщепленного 3D-домена мономера IL-22 с помощью мостикового линкерного пептида, содержащего или имеющего последовательность DSKVNR (SEQ ID NO: 315).

Е36. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле Е29 или любому из пунктов Е30-Е35, при наличии зависимости от клаузулы Е29, где N-концевая часть непрерывного 3D-домена мономера IL-10 соединена с С-концевой частью непрерывного 3D-домена мономера IL-10 с помощью сконструированного пептидного линкера, содержащего или имеющего последовательность NFGGLDY (SEQ ID NO: 316).

Е37. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул Е1-Е36, который содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 77 (фолдикин 1022), 75 (фолдикин 1022_3) и 76 (фолдикин 1022_5), или последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности.

Е38. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по клаузуле Е37, который содержит последовательность SEQ ID NO: 76 (фолдикин1022_5) или последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности.

Е39. Выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид по любой из клаузул Е1-Е38.

Е40. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по клаузуле Е39.

Е41. Вектор по клаузуле Е40, который представляет собой бактериофаговый вектор или вирусный вектор.

Е42. Клетка, экспрессирующая полипептид одноцепочечного димера цитокина по любой из клаузул Е1-Е38.

Е43. Клетка по клаузуле Е42, которая является эукариотической клеткой; особенно клеткой человека.

Е44. Клетка по клаузуле Е42, которая представляет собой рекомбинантную бактериальную клетку; где необязательно бактериальная клетка выбрана из бактериального штамма *Mycoplasma* (например, *M. pneumoniae*), *E. coli*, *L. lactis*, *S. aureus* или *B. subtilis*.

Е45. Клетка по клаузуле Е44, представляющая собой штамм *Mycoplasma*

pneumoniae, необязательно полученная из штамма M129-B7 (ATTC 29342); *Escherichia coli* BL21; или штамм *Lactococcus lactis* NZ9000 – pepN::nisRK.

E46. Клетка, содержащая полинуклеотид или вектор по любой из клаузул E39-E41.

E47. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E1-E38, клетку по любой из клаузул E42-E46 или выделенный полинуклеотид или вектор по любой из клаузул E39-E41.

E48. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любой из клаузул E1-E38, клетка по любой из клаузул E42-E46, выделенный полинуклеотид или вектор по любой из клаузул E39-E41 или фармацевтическая композиция по клаузуле E47 для применения в медицине.

E49. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле E48, где применение осуществляется в способе лечения заболевания или расстройства, выбранного из воспалительных заболеваний и расстройств; заболеваний легких; рака или пролиферативных заболеваний или состояний; инфекционных заболеваний; аллергии, иммунологических или аутоиммунных заболеваний и расстройств; поражения, дегенерации или повреждения тканей; и условий, связанных с этим.

E50. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле E49, где рака или пролиферативное заболевание или нарушение представляет собой солидную опухоль, например, выбранную из группы, состоящей из рака легкого (в частности, аденокарциномы легкого или плоскоклеточного рака легкого), рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака молочной железы, рака ободочной кишки, глиобластомы головного мозга, рака поджелудочной железы, острого моноцитарного лейкоза, рака почки, колоректального рака, рака кожи (например, меланомы), рака желудка, рака щитовидной железы, рака кости и рака печени.

E51. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле E49, где воспалительное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из аллергии, астмы, аутоиммунных заболеваний, целиакии, гломерулонефрита, гепатита, воспалительного заболевания кишечника, преперфузионного повреждения, отторжения трансплантата, диабета, болезни Альцгеймера, остеоартрита, фибромиалгии, мышечной боли в пояснице, артрита, мышечной боли в шее, миокардита,

анкилозирующего спондилита (АС), синдрома антифосфолипидных антител (АФС), миозита, ревматоидного артрита, склеродермии, синдрома Шёгрена, фиброза.

Е52. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, выделенный полинуклеотид или вектор, клетка или фармацевтическая композиция для применения по клаузуле Е51, где состояние поражения, дегенерации или повреждения ткани выбрано из группы, состоящей из колита, заживления ран, роста волос, регенерации печени и матричного синтеза.

Хотя в данной заявке проиллюстрированы и описаны конкретные воплощения, следует понимать, что могут быть сделаны различные другие изменения и модификации, не выходя за рамки заявленного объекта изобретения. Более того, хотя в данной заявке описаны различные аспекты заявленного объекта изобретения, нет необходимости использовать такие аспекты в комбинации. Таким образом, предполагается, что прилагаемая формула изобретения охватывает все такие изменения и модификации, которые находятся в пределах объема заявленного объекта изобретения, который определяется прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина, содержащий: (a) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, где последовательность одного из доменов мономера цитокина или его функциональной части не является непрерывной и прерывается последовательностью другого домена мономера цитокина или его функциональной части.

2. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 1, содержащий: (a) первый домен мономера цитокина или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, при этом последовательность второго домена мономера цитокина или его функциональной части является непрерывной, в то время как последовательность первого домена мономера цитокина такова, что первая часть последовательности первого домена мономера цитокина расположена на N-конце второго домена мономера цитокина или его функциональной части, а вторая часть последовательности первого домена мономера цитокина расположена на C-конце второго домена мономера цитокина или его функциональной части.

3. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 2, где первая часть последовательности первого домена мономера цитокина соответствует N-концевой части домена мономера природного цитокина, а вторая часть последовательности первого домена мономера цитокина соответствует C-концевой части домена мономера природного цитокина.

4. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 2 или 3, который включает:

i) расщепленный домен, который содержит свободные N- и C-концы полипептида одноцепочечного димерного цитокина, а также первую и вторую части последовательности первого домена мономера цитокина в порядке их природной последовательности; и

ii) непрерывный домен, который содержит второй домен мономера цитокина или его функциональную часть, сформированную в первую часть последовательности и вторую часть последовательности второго домена мономера цитокина, причем первая и вторая части последовательности расположены в инвертированном порядке по сравнению с порядком их природной последовательности;

при этом последовательности первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина в расщепленном домене разделены последовательностью

непрерывного домена.

5. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 3 или 4, который представляет собой полипептид одноцепочечного димера класса I, который содержит i) N-концевую часть первого мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль A и B указанного первого мономера цитокина класса I, ii) линкерный пептид, соединяющий α -спираль B указанного первого мономера цитокина класса I с α -спиралью C второго мономера цитокина класса I, iii) C-концевую часть указанного второго мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль C и D указанного второго мономера цитокина класса I, iv) линкерный пептид, соединяющий α -спираль D указанного второго мономера цитокина класса I с α -спиралью A указанного второго мономера цитокина класса I, v) N-концевую часть указанного второго мономера цитокина класса I, содержащего α -спираль A и B указанного второго мономера цитокина класса I, vi) линкерный пептид, соединяющий α -спираль B второго мономера цитокина класса I с α -спиралью C первого мономера цитокина класса I, и vii) C-концевую часть указанного первого мономера цитокина класса I, содержащую α -спираль C и D указанного первого мономера цитокина класса I.

6. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 3 или 4, который представляет собой полипептид одноцепочечного димера класса II, который содержит i) N-концевую часть первого мономера цитокина класса II, содержащую α -спираль от A до C указанного первого мономера цитокина класса II, ii) линкерный пептид, соединяющий α -спираль C указанного первого мономера цитокина класса II с α -спиралью D второго мономера цитокина класса II, iii) C-концевую часть указанного второго мономера цитокина класса II, содержащую α -спираль от D до F указанного второго мономера цитокина класса II, iv) линкерный пептид, соединяющий α -спираль F указанного второго мономера цитокина класса I с α -спиралью A указанного второго мономера цитокина класса II, v) N-концевую часть указанного второго мономера цитокина класса II, содержащий α -спираль от A до C указанного второго мономера цитокина класса II, vi) линкерный пептид, соединяющий α -спираль C второго мономера цитокина класса II с α -спиралью D первого мономера цитокина класса II, и vii) C-концевую часть указанного первого мономера цитокина класса II, содержащую α -спираль от D до F указанного первого мономера цитокина класса II.

7. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любому из пп. 3-4 и 6, который представляет собой:

- i) димерный IL-22, который содержит последовательность SEQ ID NO: 325-(Xn1)-SEQ ID NO: 326-(NtCt)-SEQ ID NO: 327-(Xn2)-SEQ ID NO:

328, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II;

ii) димерный IL-19, который содержит последовательность SEQ ID NO: 195-(Xn1)-SEQ ID NO: 196-(NtCt)-SEQ ID NO: 197-(Xn2)-SEQ ID NO: 198 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II,

iii) димерный IL-20, который содержит последовательность SEQ ID NO: 200-(Xn1)-SEQ ID NO: 201-(NtCt)-SEQ ID NO: 202-(Xn2)-SEQ ID NO: 203 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II,

iv) димерный IL-26, который содержит последовательность SEQ ID NO: 210-(Xn1)-SEQ ID NO: 211-(NtCt)-SEQ ID NO: 212-(Xn2)-SEQ ID NO: 213 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II,

v) димерный IFN λ 2, который содержит последовательность SEQ ID NO: 215-(Xn1)-SEQ ID NO: 216-(NtCt)-SEQ ID NO: 217-(Xn2)-SEQ ID NO: 218 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II,

vi) димерный IFN λ 3, который содержит последовательность SEQ ID NO: 220-(Xn1)-SEQ ID NO: 221-(NtCt)-SEQ ID NO: 222-(Xn2)-SEQ ID NO: 223 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II,

vii) димерный IFN λ 1, который содержит последовательность SEQ ID NO:

225-(Xn1)-SEQ ID NO: 226-(NtCt)-SEQ ID NO: 227-(Xn2)-SEQ ID NO: 228 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II,

viii) димерный IFN α 1/13, который содержит последовательность SEQ ID NO: 230-(Xn1)-SEQ ID NO: 231-(NtCt)-SEQ ID NO: 232-(Xn2)-SEQ ID NO: 233 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II,

ix) димерный IFN α 2, который содержит последовательность SEQ ID NO: 235-(Xn1)-SEQ ID NO: 236-(NtCt)-SEQ ID NO: 237-(Xn2)-SEQ ID NO: 238 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II,

x) димерный IFN β , который содержит последовательность SEQ ID NO: 240-(Xn1)-SEQ ID NO: 241-(NtCt)-SEQ ID NO: 242-(Xn2)-SEQ ID NO: 243 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II,

xi) димерный IFN Ω 1, который содержит последовательность SEQ ID NO: 245-(Xn1)-SEQ ID NO: 246-(NtCt)-SEQ ID NO: 247-(Xn2)-SEQ ID NO: 248 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II,

xii) димерный IFN ϵ , который содержит последовательность SEQ ID NO: 250-(Xn1)-SEQ ID NO: 251-(NtCt)-SEQ ID NO: 252-(Xn2)-SEQ ID NO: 253 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II, или

xiii) димерный IFN κ , который содержит последовательность SEQ ID NO: 255-(Xn1)-SEQ ID NO: 256-(NtCt)-SEQ ID NO: 257-(Xn2)-SEQ ID NO: 258 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономера цитокина класса II,

где (Xn1) и (Xn2) представляют собой пептидные линкеры.

8. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любому из пп. 3-4 и 6-7, который представляет собой полипептид одноцепочечного димерного IL-22, который содержит последовательности SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 287 или SEQ ID NO: 288, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере одинаковую стабильность и/или по меньшей мере одинаковый уровень взаимодействия с 1 рецептором IL-22 и/или 2 рецептором IL-22.

9. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любому из пп. 3-4 и 6, при условии, что одноцепочечный химерный полипептид IL-10-IL-22 содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 76 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 80%, которые сохраняют по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с рецептором IL-10 и рецептором IL-22.

10. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 2, где первая часть последовательности первого домена мономера цитокина соответствует С-концевой части домена мономера природного цитокина, а вторая часть последовательности первого домена мономера цитокина соответствует N-концевой части домена мономера природного цитокина.

11. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 2 или 10, который включает:

i) расщепленный домен, который содержит свободные N- и С-концы полипептида одноцепочечного димерного цитокина, а также первую и вторую части последовательности первого домена мономера цитокина в порядке, инвертированном по сравнению с порядком в природной последовательности; и

ii) непрерывный домен, который содержит второй домен мономера цитокина или его функциональную часть в порядке природной последовательности;

при этом последовательности первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина в расщепленном домене разделены последовательностью непрерывного домена.

12. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 10 или 11, который представляет собой полипептид одноцепочечного димера класса I, где:

- a) линкерный пептид соединяет четвертую α -спираль первого мономера цитокина класса I с первой α -спиралью второго мономера цитокина класса I;
- b) линкерный пептид соединяет четвертую α -спираль второго мономера цитокина класса I с первой α -спиралью первого мономера цитокина класса I; и либо α -спирали A и B указанного первого мономера цитокина класса I не соединены мостиками, либо α -спирали B и C указанного первого мономера цитокина класса I не соединены мостиками, либо α -спирали C и D указанного первого мономера цитокина класса I не соединены мостиками.

13. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любому из пп. 10-12, который основан на короткоцепочечном цитокине класса I и представляет собой:

- i) димерный IL-2, который содержит SEQ ID NO: 89-(Xn1)-SEQ ID NO: 90-(Xn2)-SEQ ID NO: 91,
 - ii) димерный IL-4, который содержит SEQ ID NO: 93-(Xn1)-SEQ ID NO: 94-(Xn2)-SEQ ID NO: 95,
 - iii) димерный IL-3, который содержит SEQ ID NO: 97-(Xn1)-SEQ ID NO: 98-(Xn2)-SEQ ID NO: 99,
 - iv) димерный IL-7, который содержит SEQ ID NO: 103-(Xn1)-SEQ ID NO: 104-(Xn2)-SEQ ID NO: 105,
 - v) димерный IL-9, который содержит SEQ ID NO: 107-(Xn1)-SEQ ID NO: 108-(Xn2)-SEQ ID NO: 109,
 - vi) димерный IL-15, который содержит SEQ ID NO: 110-(Xn1)-SEQ ID NO: 111-(Xn2)-SEQ ID NO: 112,
 - vii) димерный IL-21, который содержит SEQ ID NO: 113-(Xn1)-SEQ ID NO: 114-(Xn2)-SEQ ID NO: 115,
 - viii) димерный TSLP, который содержит SEQ ID NO: 116-(Xn1)-SEQ ID NO: 117-(Xn2)-SEQ ID NO: 118, и
 - ix) димерный GM-CSF (который может содержать или состоять из SEQ ID NO: 120-(Xn1)-SEQ ID NO: 121-(Xn2)-SEQ ID NO: 122-SEQ ID NO: 101),
- или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного короткоцепочечного цитокина класса I,
- где (Xn1) и (Xn2) представляют собой пептидные линкеры.

14. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любому из пп. 10-12, который основан на длинноцепочечном цитокине класса I и представляет собой:

i) димерный IL-6, который содержит SEQ ID NO: 135-(Xn1)-SEQ ID NO: 136-(Xn2)-SEQ ID NO: 137,

ii) димерный IL-11, который содержит SEQ ID NO: 139-(Xn1)-SEQ ID NO: 140-(Xn2)-SEQ ID NO: 141,

iii) димерный IL-12 α , который содержит SEQ ID NO: 143-(Xn1)-SEQ ID NO: 144-(Xn2)-SEQ ID NO: 145,

iv) димерный IL-23 α , который содержит SEQ ID NO: 147-(Xn1)-SEQ ID NO: 148-(Xn2)-SEQ ID NO: 149,

v) димерный IL-27 α , который содержит SEQ ID NO: 151-(Xn1)-SEQ ID NO: 152-(Xn2)-SEQ ID NO: 153,

vi) димерный IL-31, который содержит SEQ ID NO: 154-(Xn1)-SEQ ID NO: 155-(Xn2)-SEQ ID NO: 156,

vii) димерный CLCF1, который содержит SEQ ID NO: 158-(Xn1)-SEQ ID NO: 159-(Xn2)-SEQ ID NO: 160,

viii) димерный ONCM, который содержит SEQ ID NO: 161-(Xn1)-SEQ ID NO: 162-(Xn2)-SEQ ID NO: 163,

ix) димерный CTF1, который содержит SEQ ID NO: 165-(Xn1)-SEQ ID NO: 166-(Xn2)-SEQ ID NO: 167,

x) димерный CNTF, который содержит SEQ ID NO: 169-(Xn1)-SEQ ID NO: 170-(Xn2)-SEQ ID NO: 171,

xi) димерный LIF, который содержит SEQ ID NO: 173-(Xn1)-SEQ ID NO: 174-(Xn2)-SEQ ID NO: 175, и

xii) димерный CSF3, который содержит SEQ ID NO: 177-(Xn1)-SEQ ID NO: 178-(Xn2)-SEQ ID NO: 179),

или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 80%, которая сохраняет по меньшей мере такую же стабильность и/или по меньшей мере тот же уровень взаимодействия с соответствующим(и) рецептором(ами) указанного мономерного длинноцепочечного цитокина класса I;

где (Xn1) и (Xn2) представляют собой пептидные линкеры.

15. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любому из пп. 10-13, который представляет собой димерный IL-2 и содержит SEQ ID NO: 89-(Xn1)-SEQ ID NO: 90-(Xn2)-SEQ ID NO: 91, где пептидные линкеры Xn1 и Xn2 идентичны и содержат или состоят из SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 273, SEQ

ID NO: 274 или SEQ ID NO: 275.

16. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 10 или 11, который представляет собой полипептид одноцепочечного димера класса II, где:

- a) линкерная последовательность соединяет первую α -спираль первого мономера цитокина класса II с шестой α -спиралью второго мономера цитокина класса II;
- b) линкерная последовательность соединяет шестую α -спираль указанного первого мономера цитокина класса II с первой α -спиралью указанного второго мономера цитокина класса II; и
- c) первая и вторая вторая α -спирали, вторая и третья α -спирали, третья и четвертая α -спирали, четвертая и пятая α -спирали или пятая и шестая α -спирали указанного первого мономера цитокина класса II не соединены мостиками.

17. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 1, который содержит (a) домен первого мономера цитокина класса I или его функциональную часть; и (b) второй домен мономера цитокина класса I или его функциональную часть, причем последовательность первого домена мономера цитокина класса I или его функциональной части является непрерывной последовательностью, в то время как последовательность второго домена мономера цитокина такова, что первая часть последовательности второго мономера цитокина класса I, которая расположена на N-конце первого мономера цитокина класса I или его функциональной части, соответствует N-концевой части мономера природного цитокина класса I, а вторая часть последовательности второго мономера цитокина класса I, которая расположена на C-конце второго мономера цитокина класса I или его функциональной части, соответствует C-концевой части мономера природного цитокина класса I.

18. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 1 или 17, который включает:

i) расщепленный домен, который содержит свободные N- и C-концы полипептида одноцепочечного димерного цитокина класса I, а также первую и вторую части последовательности домена второго мономера цитокина класса I; и

ii) непрерывный домен, который содержит первый домен мономера цитокина класса I или его функциональную часть;

при этом последовательности первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина класса I в расщепленном домене разделены последовательностью непрерывного домена.

19. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 17 или 18, где:

- a) линкерный пептид соединяет четвертую α -спираль первого мономера цитокина класса I с третьей α -спиралью второго мономера цитокина класса I;
- b) линкерный пептид соединяет первую α -спираль первого мономера цитокина класса I со второй α -спиралью второго мономера цитокина класса I;
- c) линкерный пептид соединяет первую α -спираль (α -спираль A) первого мономера цитокина класса I со второй α -спиралью второго мономера цитокина класса I; и
- d) α -спирали B и C указанного второго мономера цитокина класса I не соединены мостиками.

20. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любому из пп. 17-19, который представляет собой полипептид одноцепочечного димера П-2, который содержит последовательность SEQ ID NO: 296 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80% и сохраняющую по меньшей мере такую же стабильность. и/или по меньшей мере такой же уровень взаимодействия с рецептором П-2.

21. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 1, который содержит: (a) домен первого мономера цитокина класса II или его функциональную часть; и (b) домен второго мономера цитокина класса II или его функциональную часть, где последовательность домена мономера цитокина II класса или его функциональной части является непрерывной по последовательности и инвертированной по сравнению с порядком в его природной последовательности, в то время как последовательность первого домена мономера цитокина класса II такова, что первая часть последовательности первого домена мономера цитокина класса II, которая расположена на N-конце второго домена мономера цитокина класса II, или его функциональной части, соответствует N-концевой части домена мономера природного цитокина класса II, а вторая часть последовательности первого домена мономера цитокина класса II, которая расположена на C-конце второго домена мономера цитокина класса II или его функциональной части, соответствует C-концевой части домена мономера природного цитокина класса II.

22. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 2 или 21, который представляет собой полипептид одноцепочечного димерного цитокина класса II, который включает:

- i) расщепленный домен, который содержит свободные N- и C-концы полипептида одноцепочечного димерного цитокина класса II, а также первую и вторую части последовательности домена первого мономера цитокина класса II в порядке в их природной последовательности; и
- ii) непрерывный домен, который содержит домен второго мономера цитокина

класса II или его функциональную часть;

при этом последовательности первой и второй частей последовательности первого домена мономера цитокина II класса в расщепленном домене разделены последовательностью непрерывного домена второго мономера цитокина класса II.

23. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по любому из пп. 5-7, 12-16 и 19, где линкерные пептиды имеют последовательность, состоящую из от около 3 до около 20 аминокислот, от около 3 до около 16 аминокислот, от около 4 до около 12 аминокислот, от около 4 до около 8 аминокислот, от около 3 до около 8 аминокислот или от около 3 до около 6 аминокислот; и где последовательности линкерного пептида содержат 5 или менее и предпочтительно 3 или менее смежных остатков Gly и/или Ser; где необязательно линкерные пептиды представляют собой структурированные линкеры.

24. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 1, который содержит первый и второй домены мономера цитокина, которые образуют димеры обмениваемого домена, которые являются цитокинами класса I, и указанный полипептид одноцепочечного димерного цитокина содержит от N-конца до C-конца первый домен мономера цитокина, который содержит спирали A до C второго мономера цитокина, и спираль D первого мономера цитокина, и второй домен мономера цитокина, который содержит спираль D второго мономера цитокина и спирали от A до C первого мономера цитокина, причем линкерный пептид соединяет спираль D второго мономера цитокина со спиралью A первого мономера цитокина.

25. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 24, который представляет собой полипептид димерного IL-5, который содержит последовательность SEQ ID NO: 101-(NtCt)-SEQ ID NO: 102, где (NtCt) представляет собой пептидный линкер, или последовательность, идентичную ему по меньшей мере на 80% и сохраняющую по меньшей мере ту же стабильность и/или, по меньшей мере, тот же уровень взаимодействия с рецептором IL-5.

26. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 1, который содержит первый и второй мономеры цитокина, которые образуют димеры обмениваемого домена и которые являются цитокинами класса II, и указанный полипептид одноцепочечного димера цитокина содержит от N-конца до C-конца первый домен мономера цитокина, который содержит спирали A до C второго мономера цитокина, и спирали от D до F первого мономера цитокина, и второй домен мономера цитокина, который содержит спирали от D до F второго мономера цитокина и спирали от A до C первого мономера цитокина, где линкерный пептид соединяет спираль F второго мономера цитокина со спиралью A первого мономера цитокина.

27. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 26, который представляет собой одноцепочечный димерный IL-10 и содержит последовательность SEQ ID NO: 11-(NtCt)-SEQ ID NO: 12, где (NtCt) представляет собой пептидный линкер, или последовательность, идентичную ему по меньшей мере на 80% и сохраняющую по меньшей мере ту же стабильность и/или, по меньшей мере, тот же уровень взаимодействия с рецептором IL-10.

28. Полипептид одноцепочечного димера IL-10 по п. 27, который содержит SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10, или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 80% и сохраняющую по меньшей мере ту же стабильность и/или, по меньшей мере, тот же уровень взаимодействия с рецептором IL-10.

29. Полипептид одноцепочечного димерного цитокина по п. 26, который представляет собой одноцепочечный димерный IFN γ и содержит последовательность SEQ ID NO: 14-(NtCt)-SEQ ID NO: 15, где (NtCt) представляет собой пептидный линкер, или последовательность, идентичную ему по меньшей мере на 80% и сохраняющую по меньшей мере ту же стабильность и/или, по меньшей мере, тот же уровень взаимодействия с рецептором IFN γ .

30. Полипептид одноцепочечного димера по п. 29, который содержит SEQ ID NO: 18 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 80% и сохраняющую по меньшей мере ту же стабильность и/или, по меньшей мере, тот же уровень взаимодействия с рецептором IFN γ .

31. Полипептид, содержащий полипептид одноцепочечного димера по любому из пп. 1-30.

32. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, определенный в любом из пп. 1-31.

33. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, определенную в п. 32.

34. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, определенную в п. 32, или экспрессирующий вектор, определенный в п. 33.

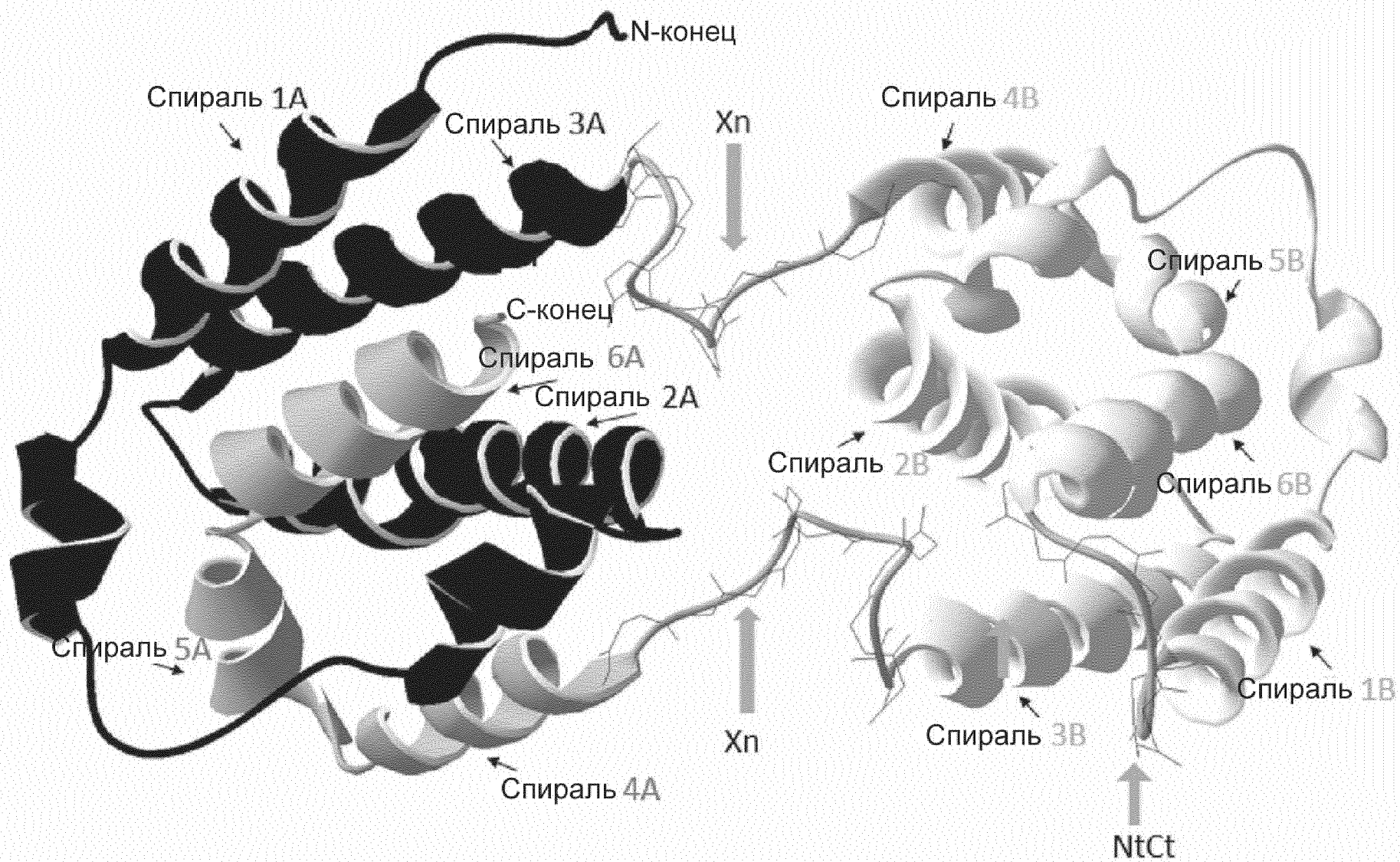
35. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1-31.

36. Способ лечения заболевания, включающий введение полипептида, определенного в любом из пп. 1-31, субъекту, нуждающемуся в этом, необязательно субъекту, которому будет полезно снижение или увеличение воспалительной реакции или скорости пролиферации клеток.

37. Полипептид по любому из пп. 1-31 для применения при лечении заболевания,

необязательно заболевания, при котором будет полезно снижение или увеличение воспалительной реакции или скорости пролиферации клеток.

38. Полипептид по любому из пп. 1-31, предназначенный для производства лекарственного средства для лечения заболевания, необязательно заболевания, при котором будет полезно снижение или увеличение воспалительной реакции или скорости пролиферации клеток.

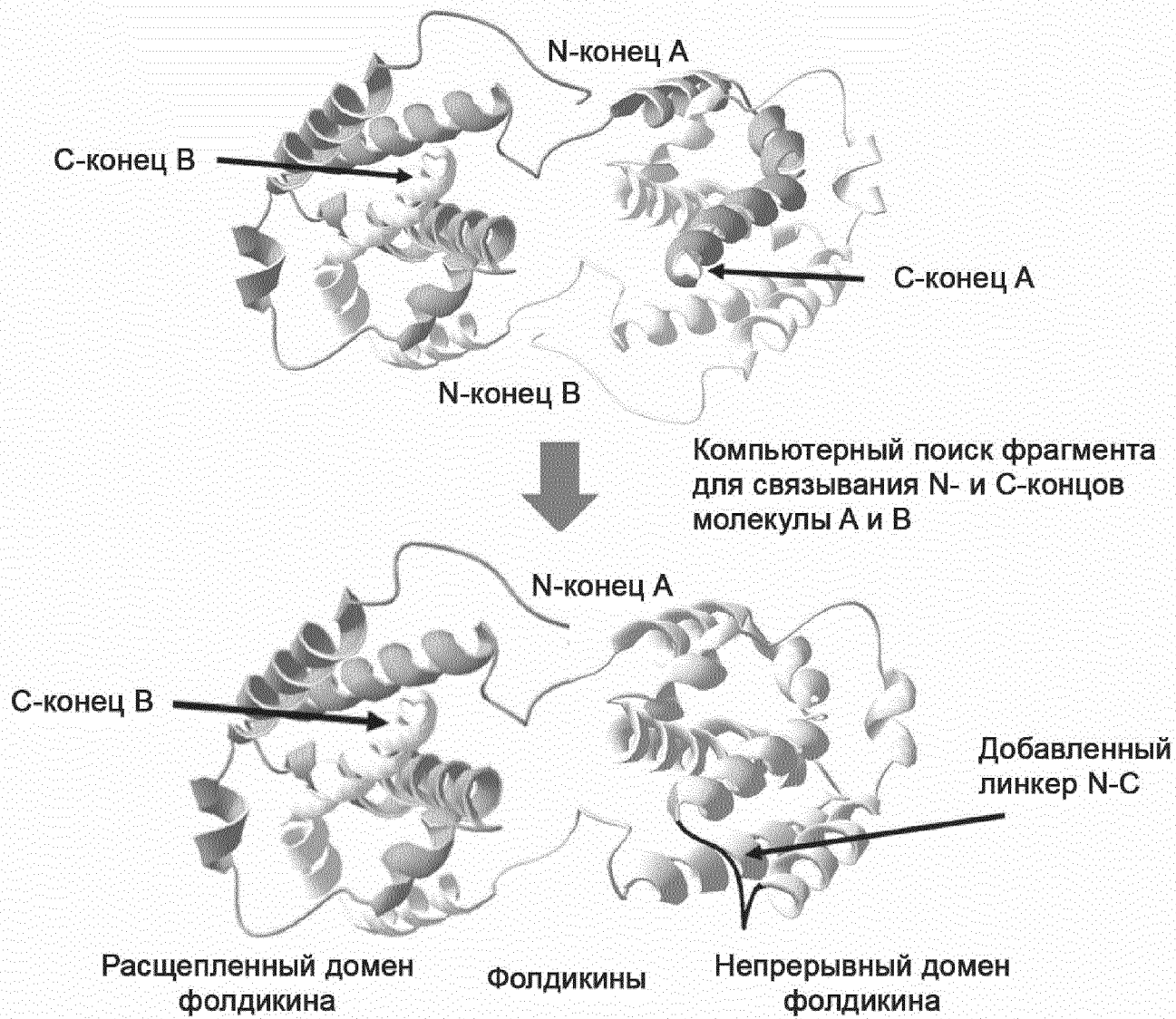


ФИГ. 1

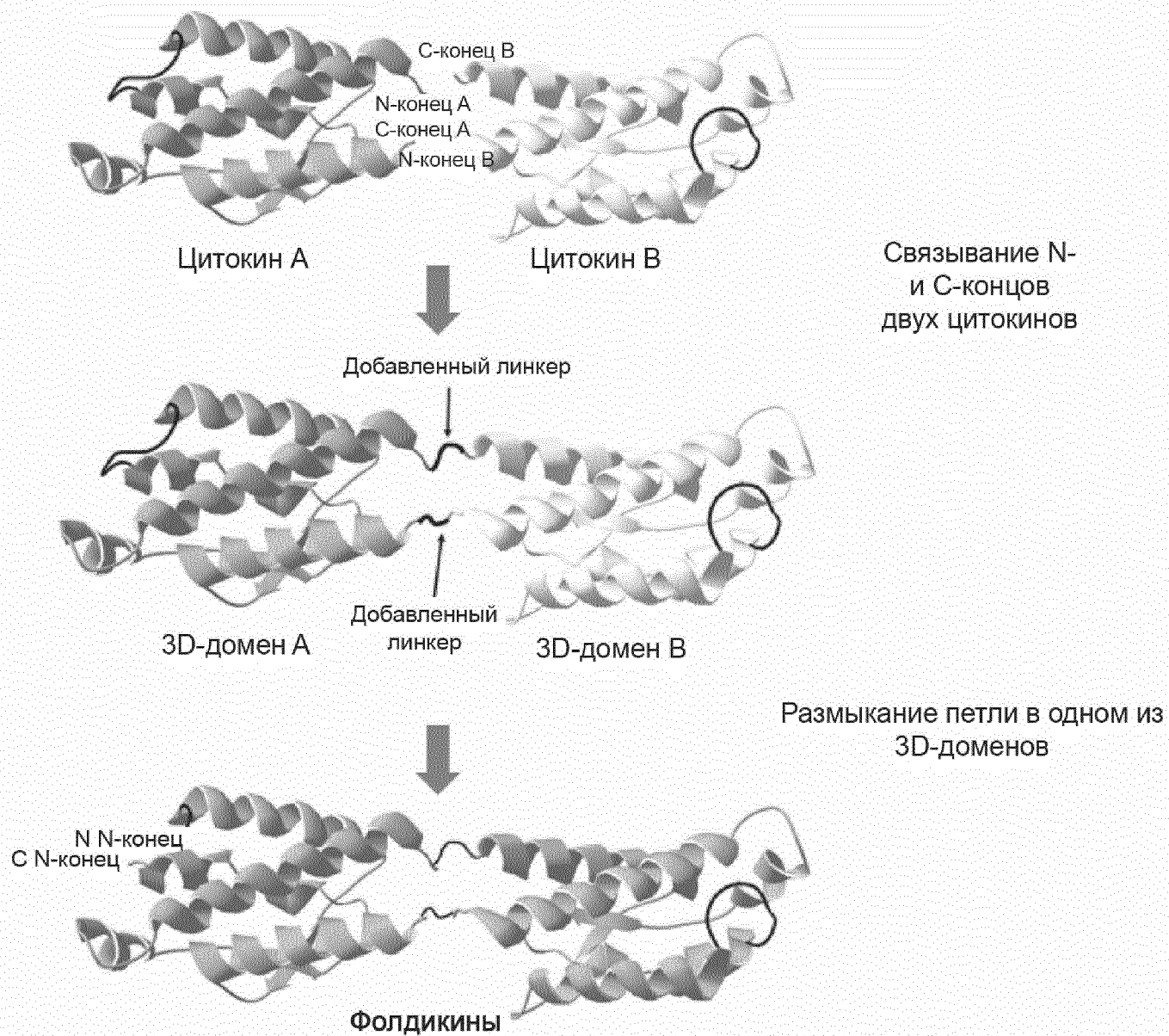
Фолдикины, проблема и решения



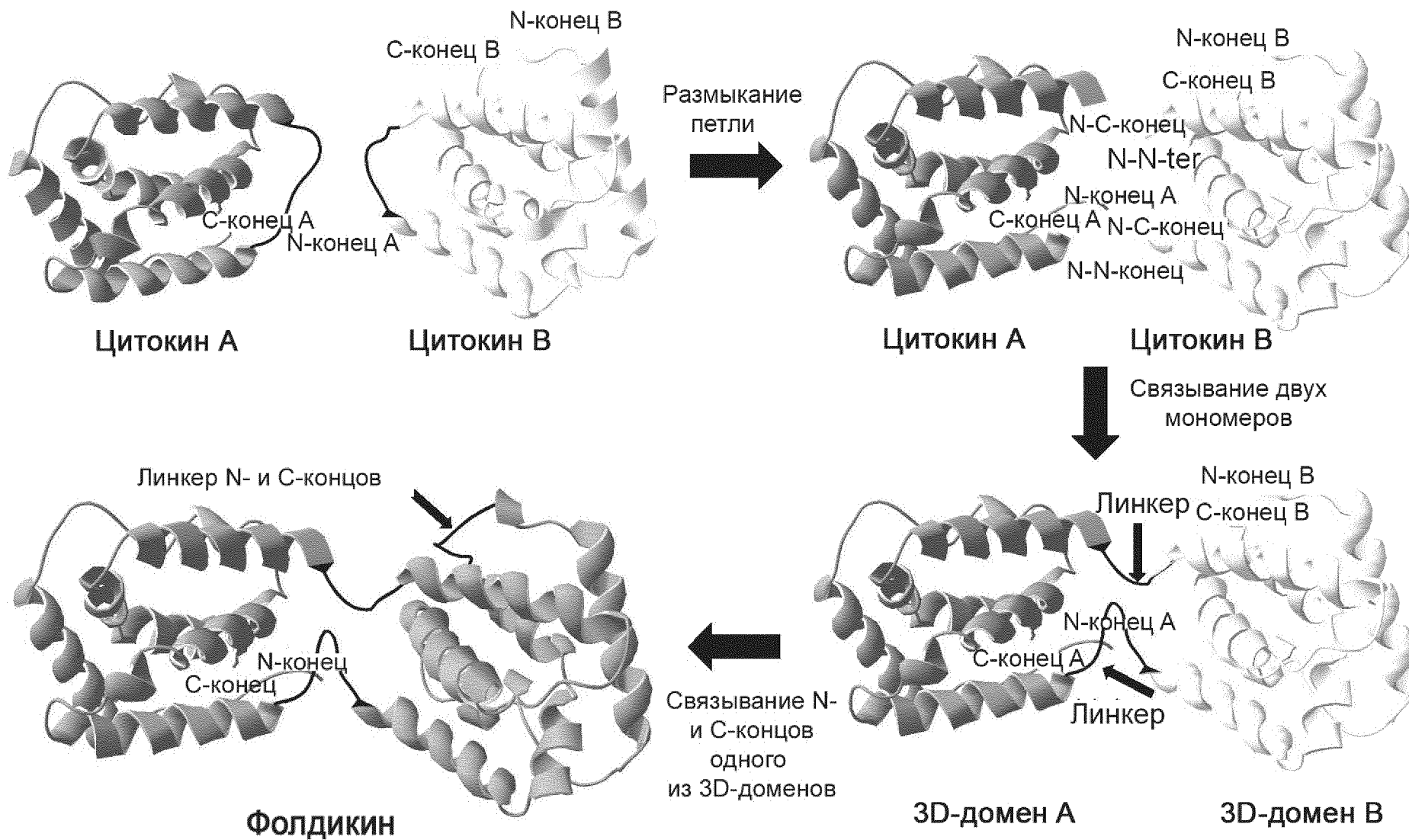
Фиг. 2



ФИГ. 3

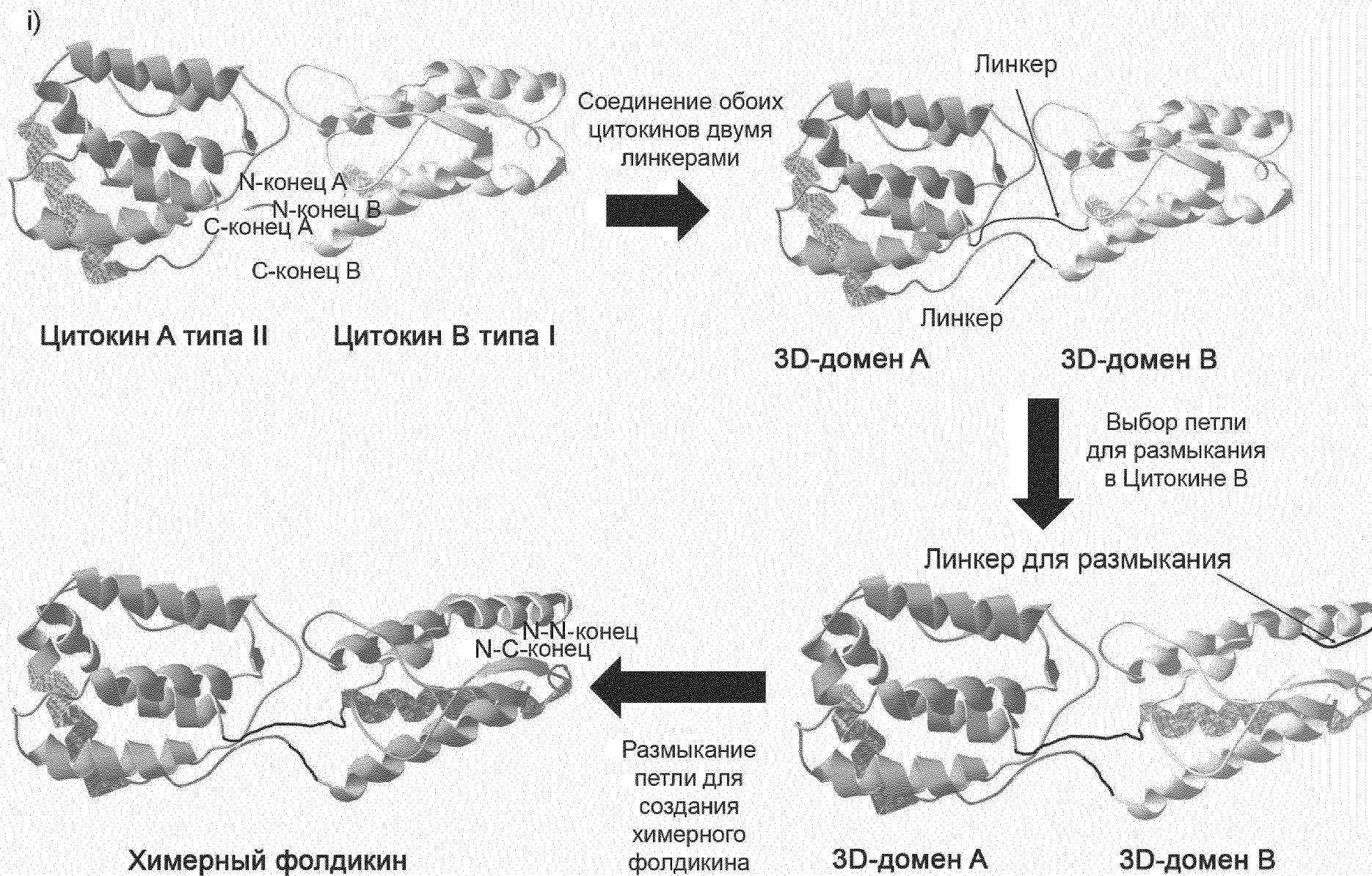


ФИГ. 4



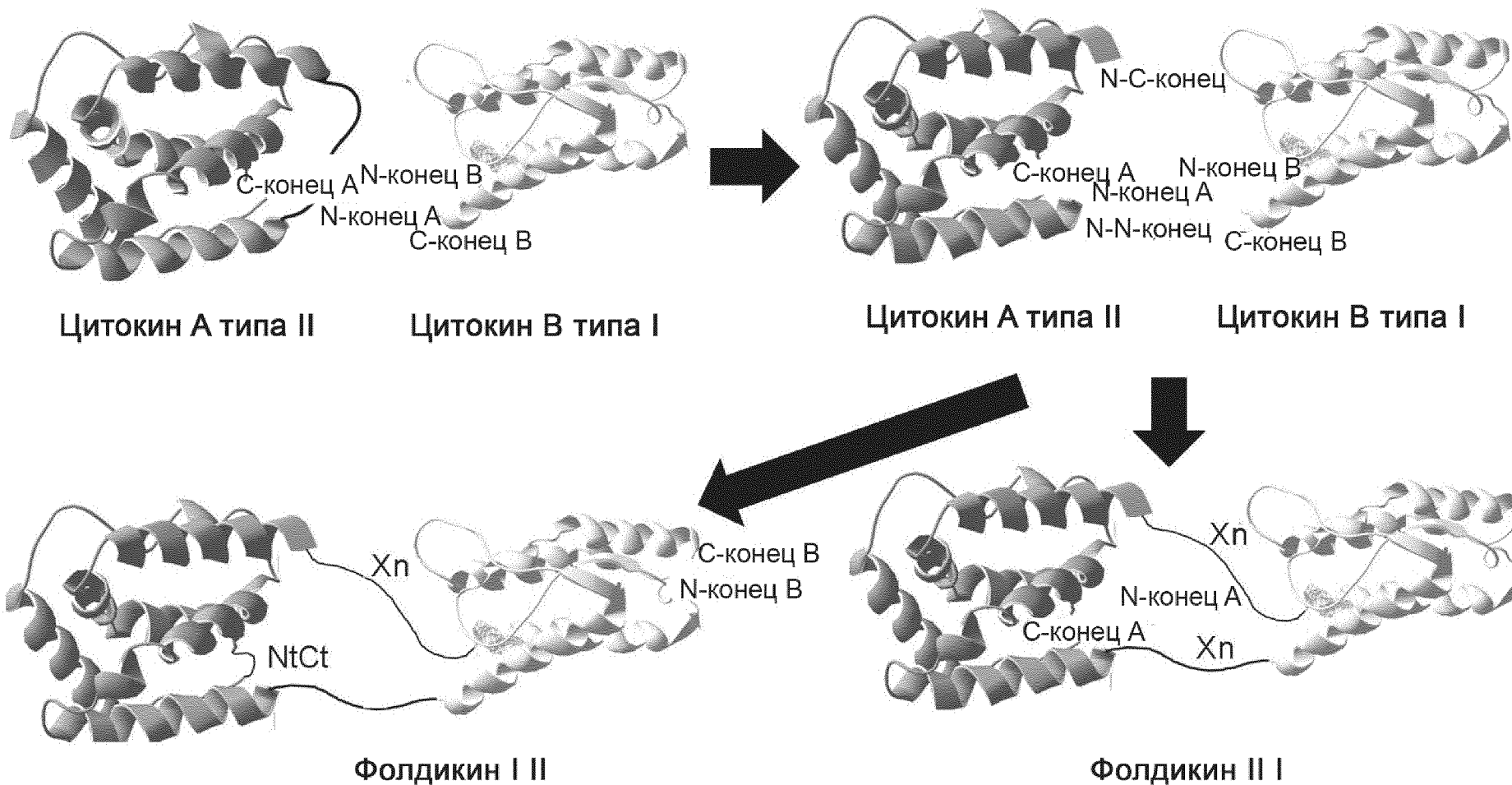
5/43

Фиг. 5

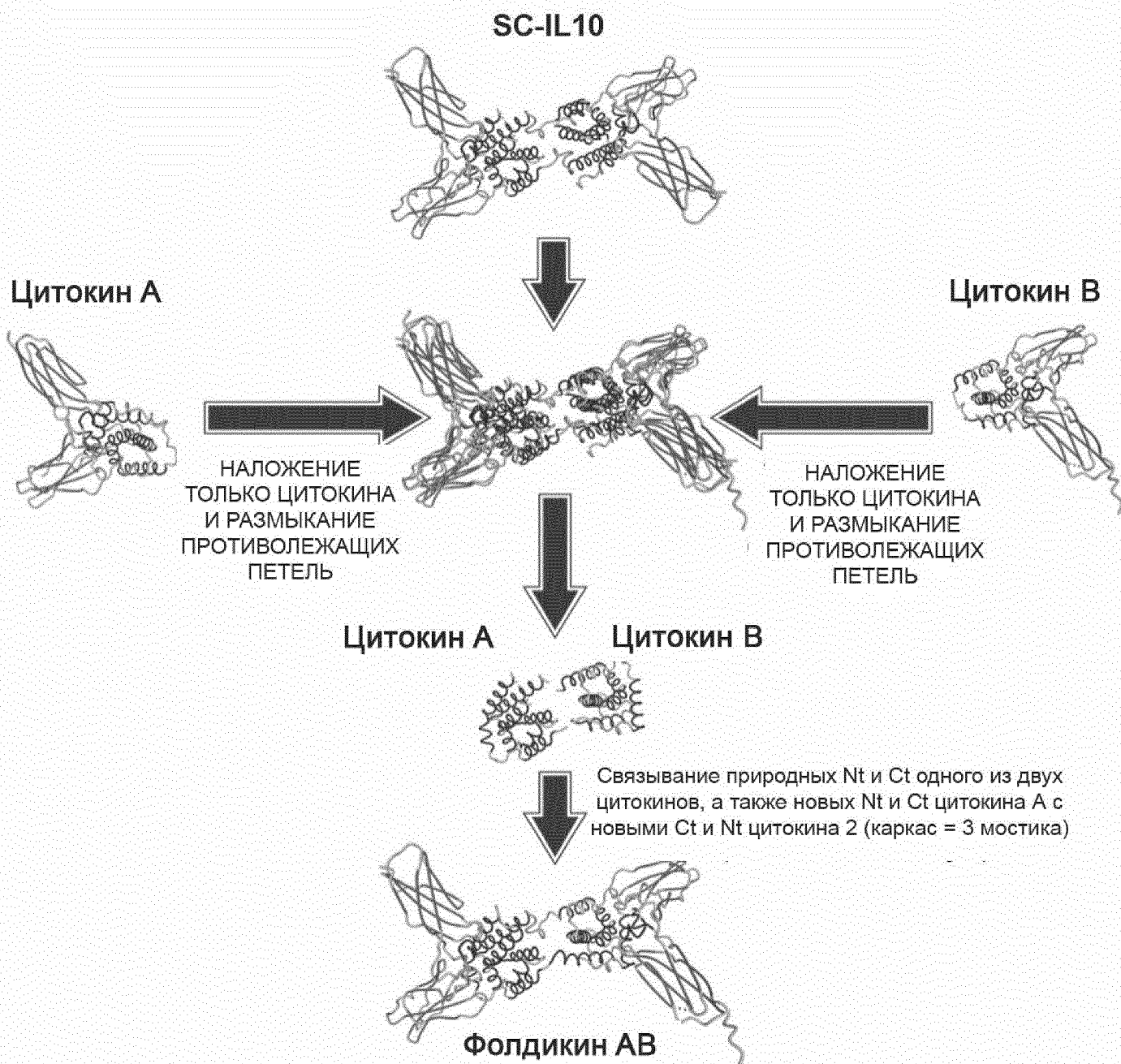


ФИГ. 6 (НАЧАЛО)

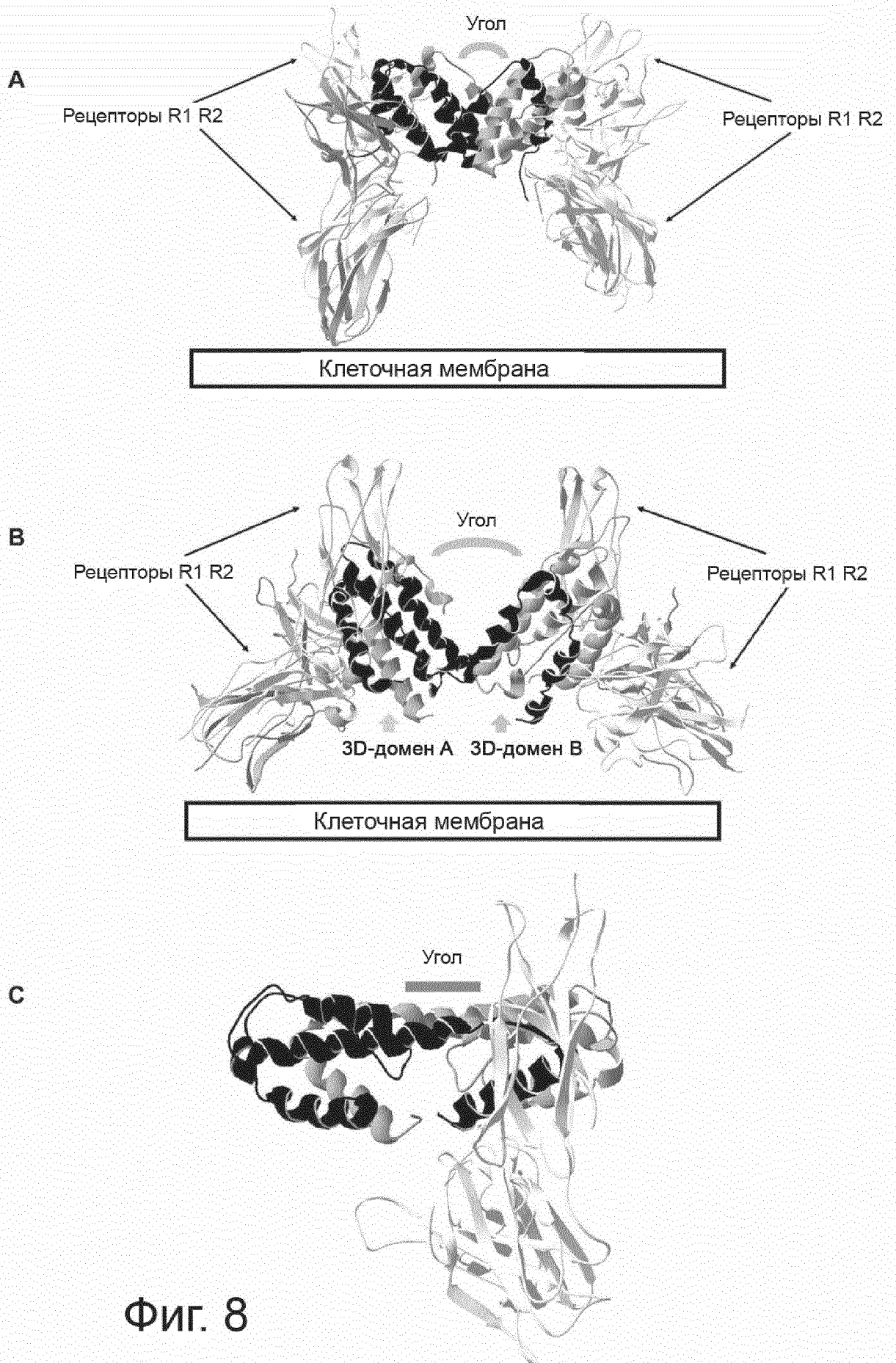
ii)



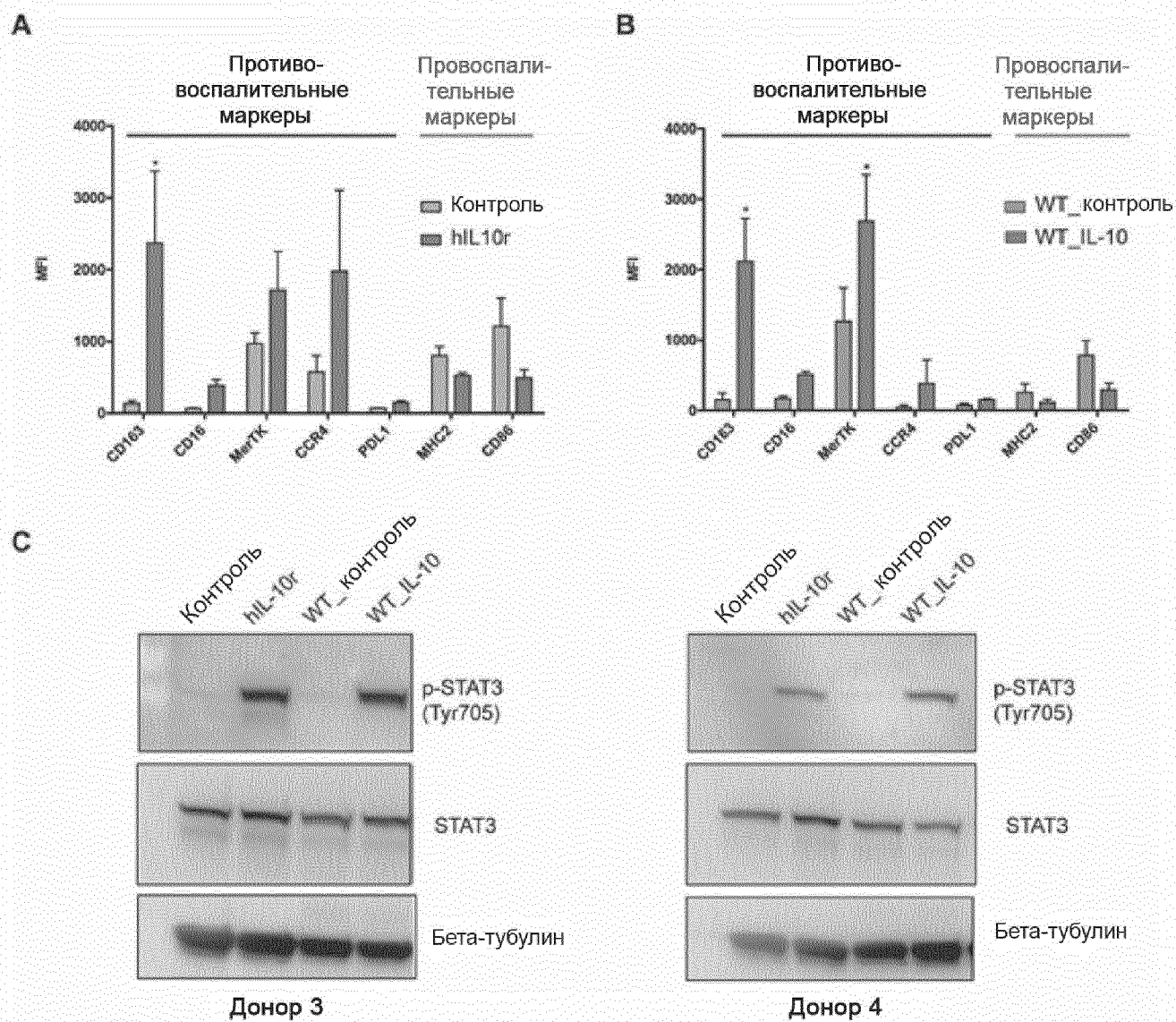
ФИГ. 6 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



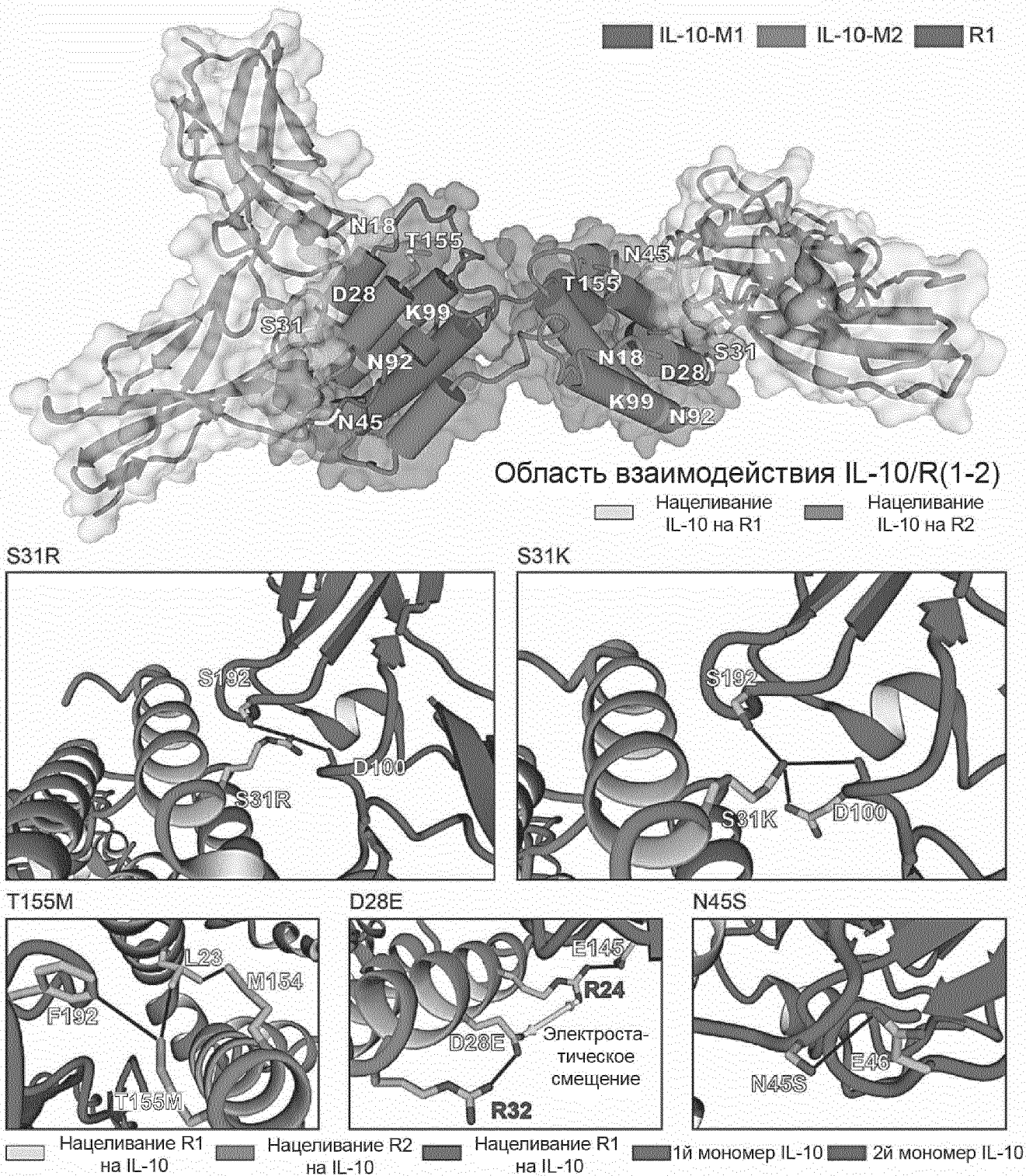
ФИГ. 7



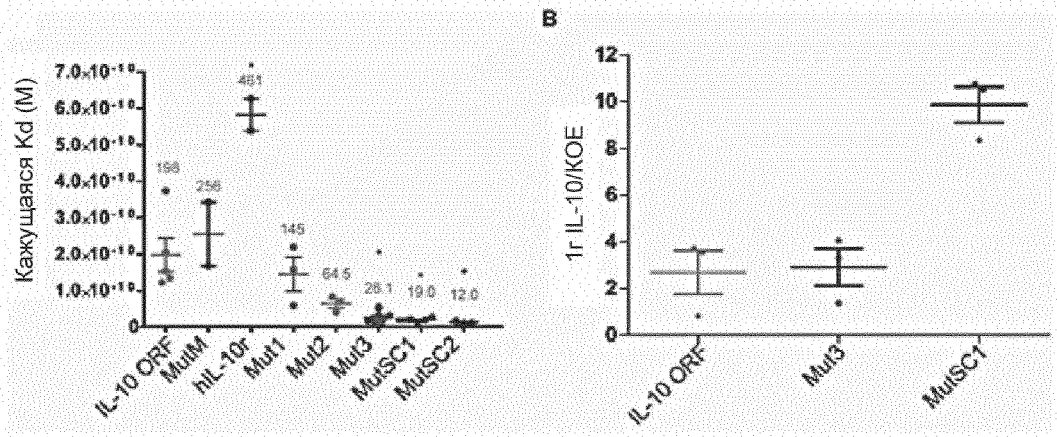
Фиг. 8



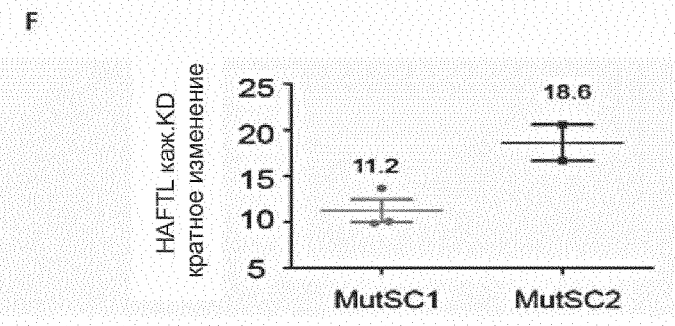
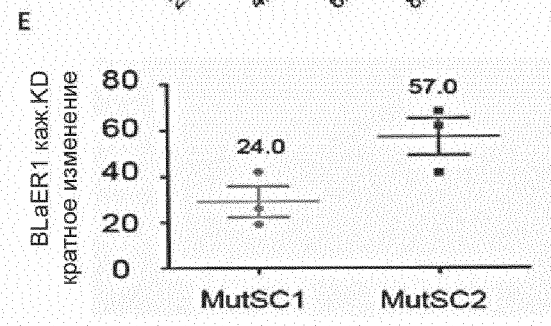
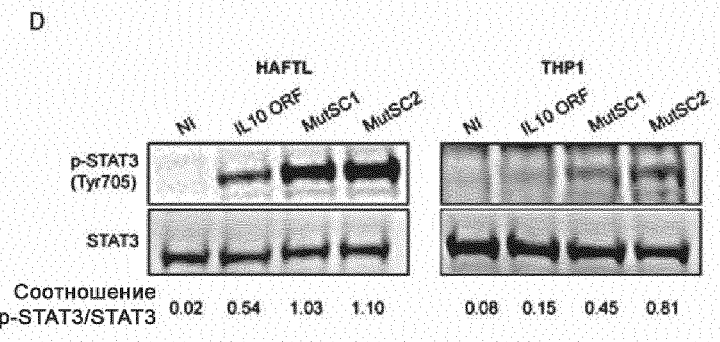
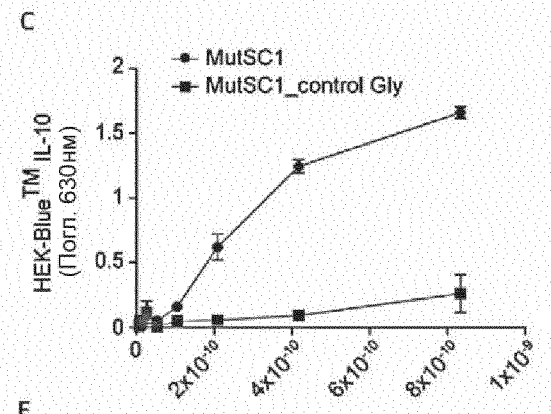
ФИГ. 9



Фиг. 10

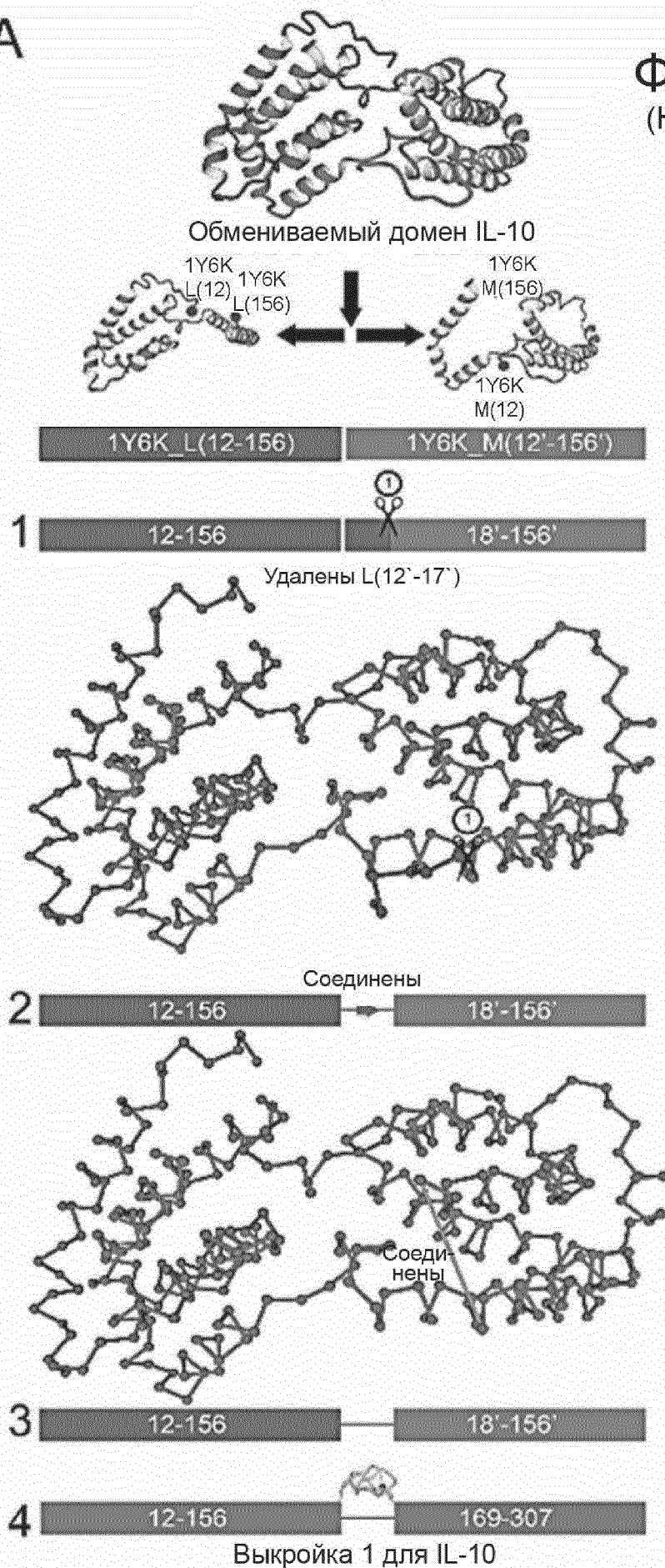


ФИГ. 11



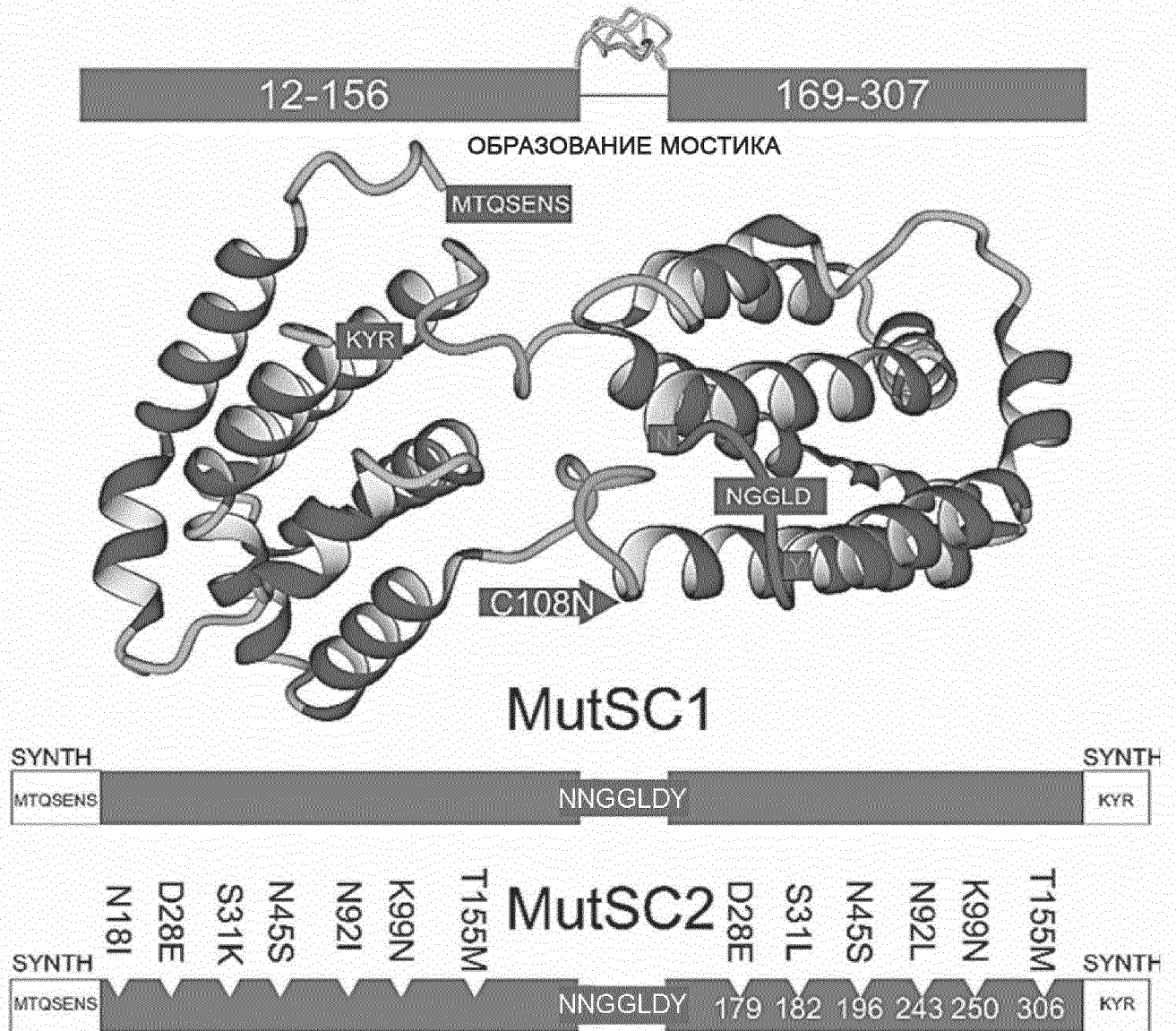
A

Фиг. 12
(НАЧАЛО)

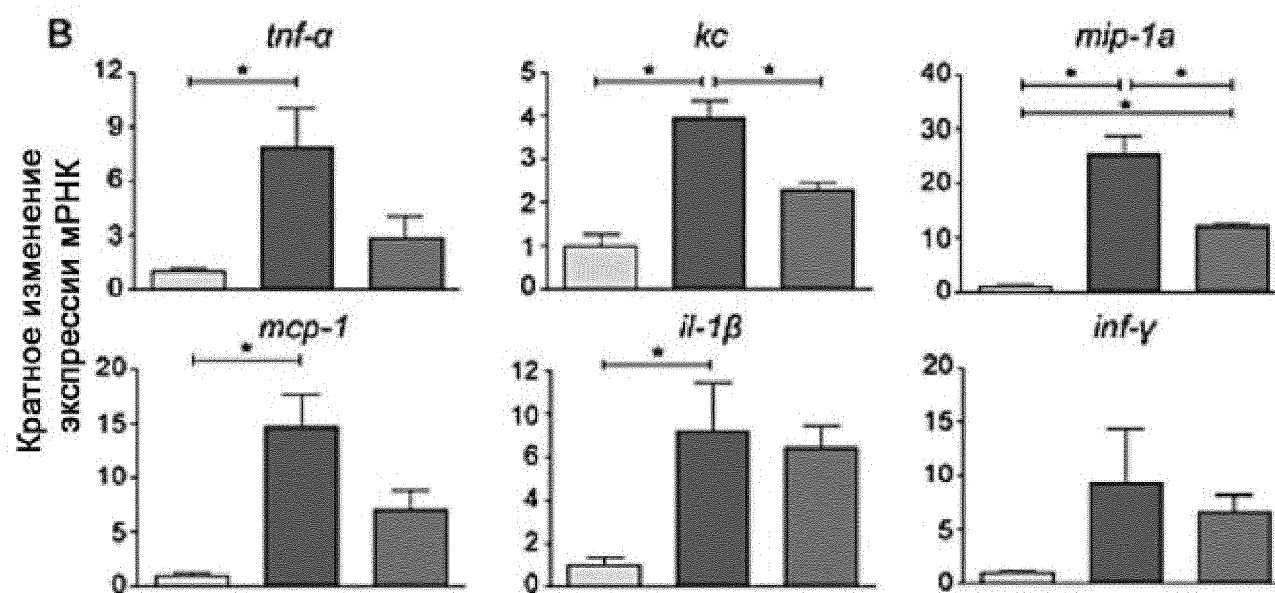
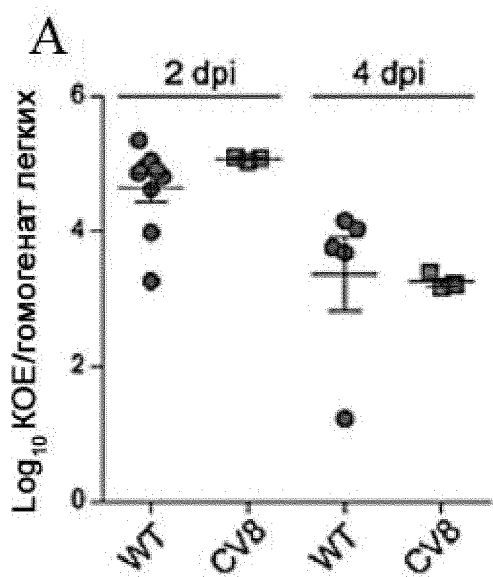


B

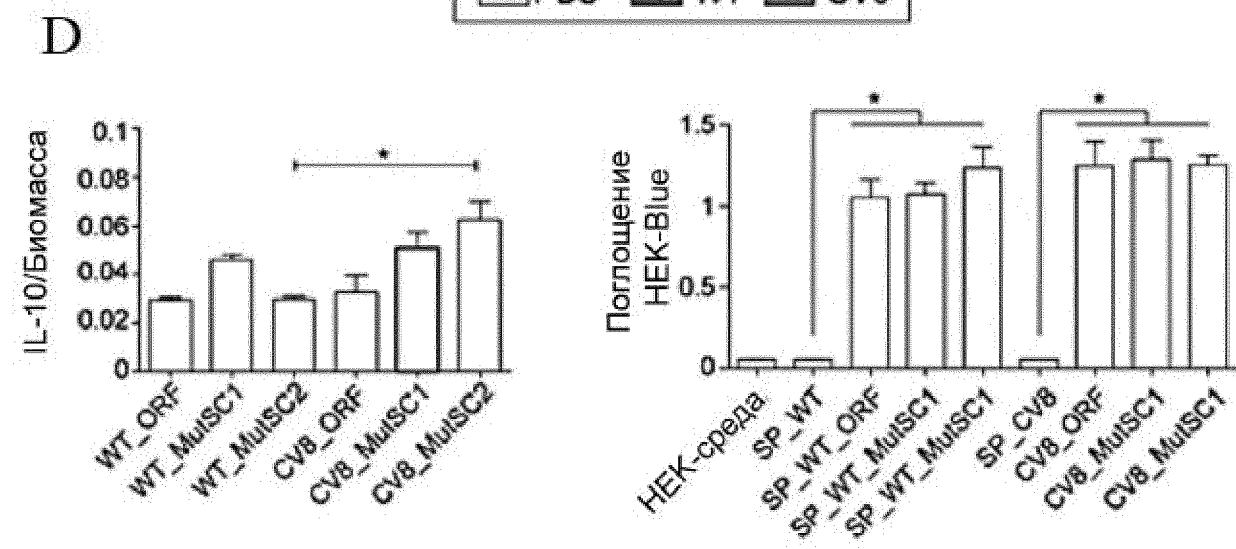
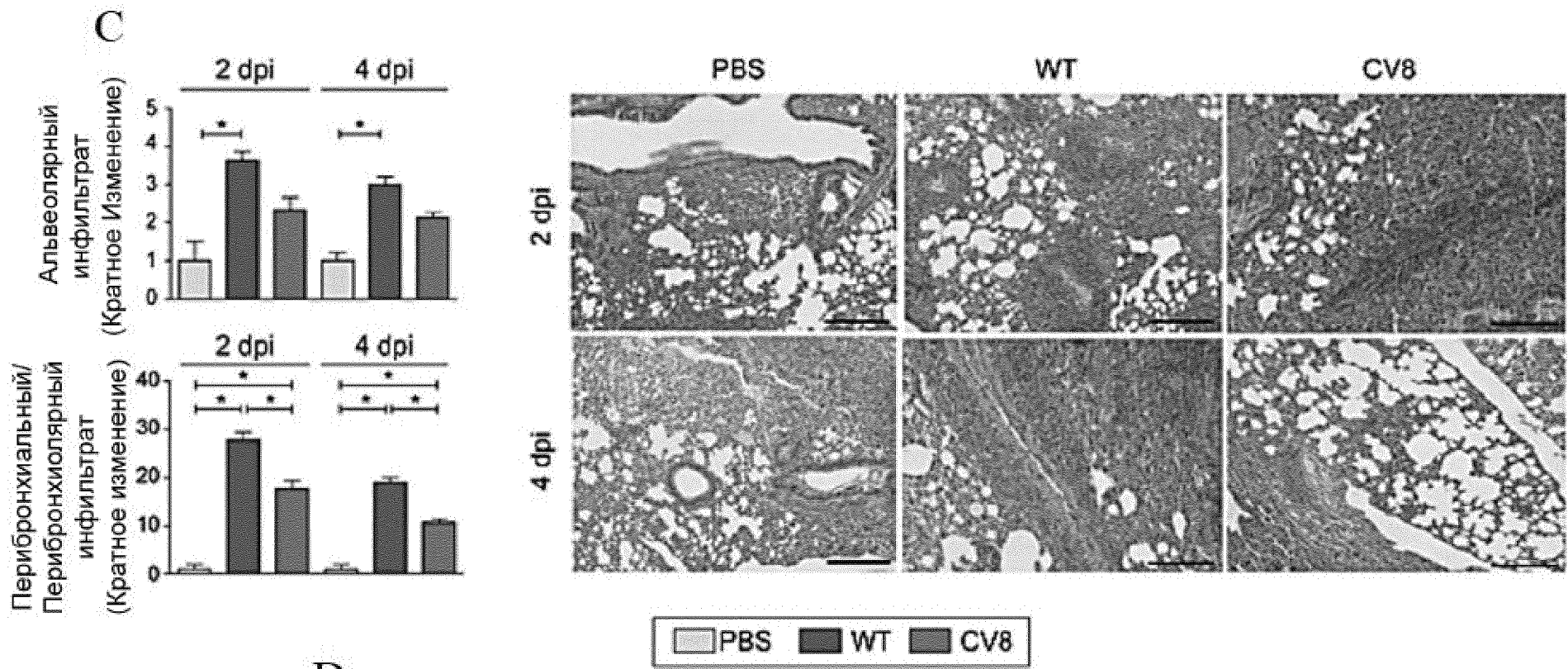
IL-10 выкройка



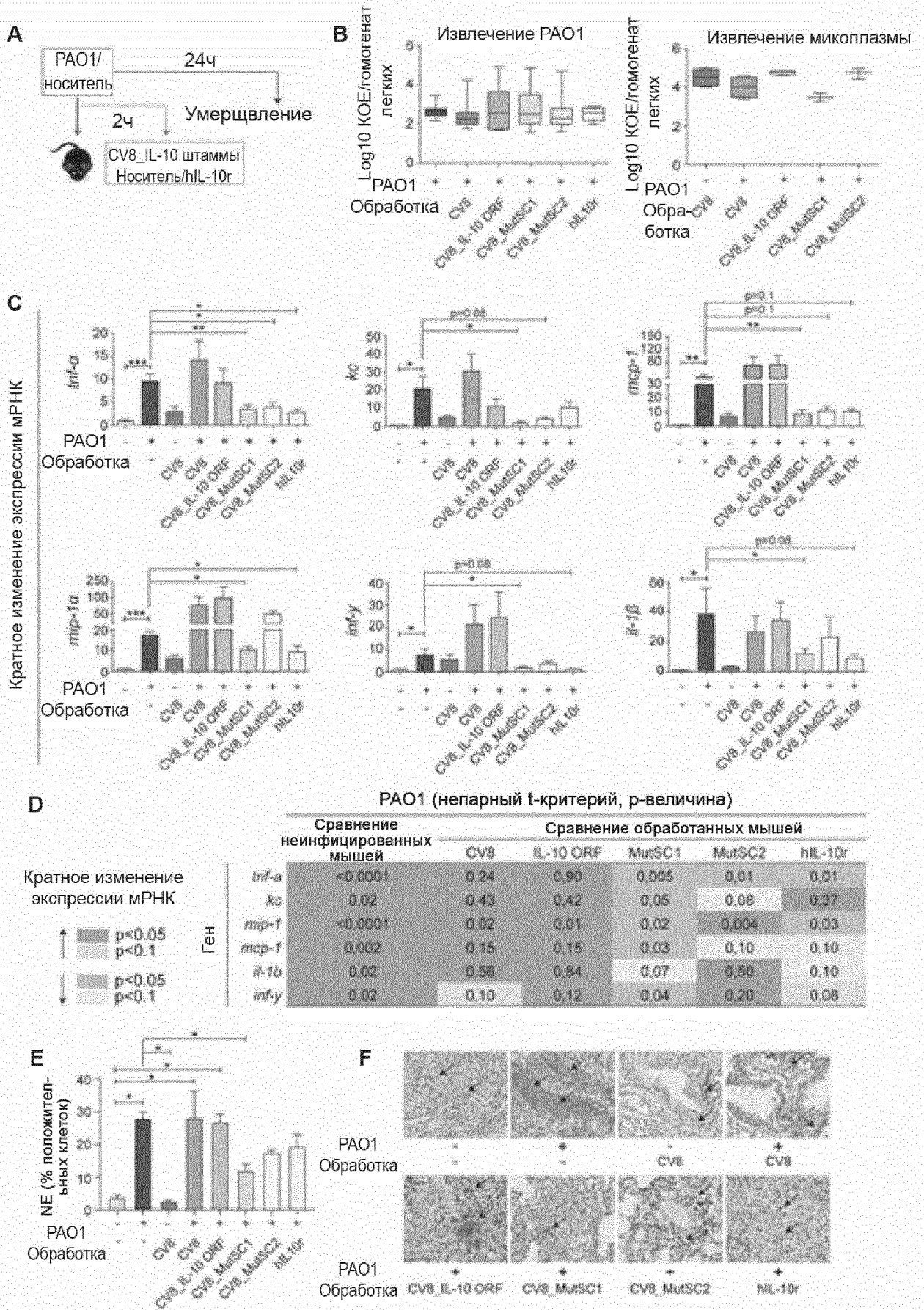
Фиг. 12
(ПРОДОЛЖЕНИЕ)



ФИГ. 13 (НАЧАЛО)



ФИГ. 13
(ПРОДОЛЖЕНИЕ)



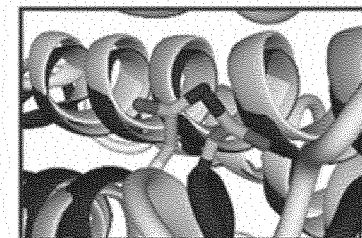
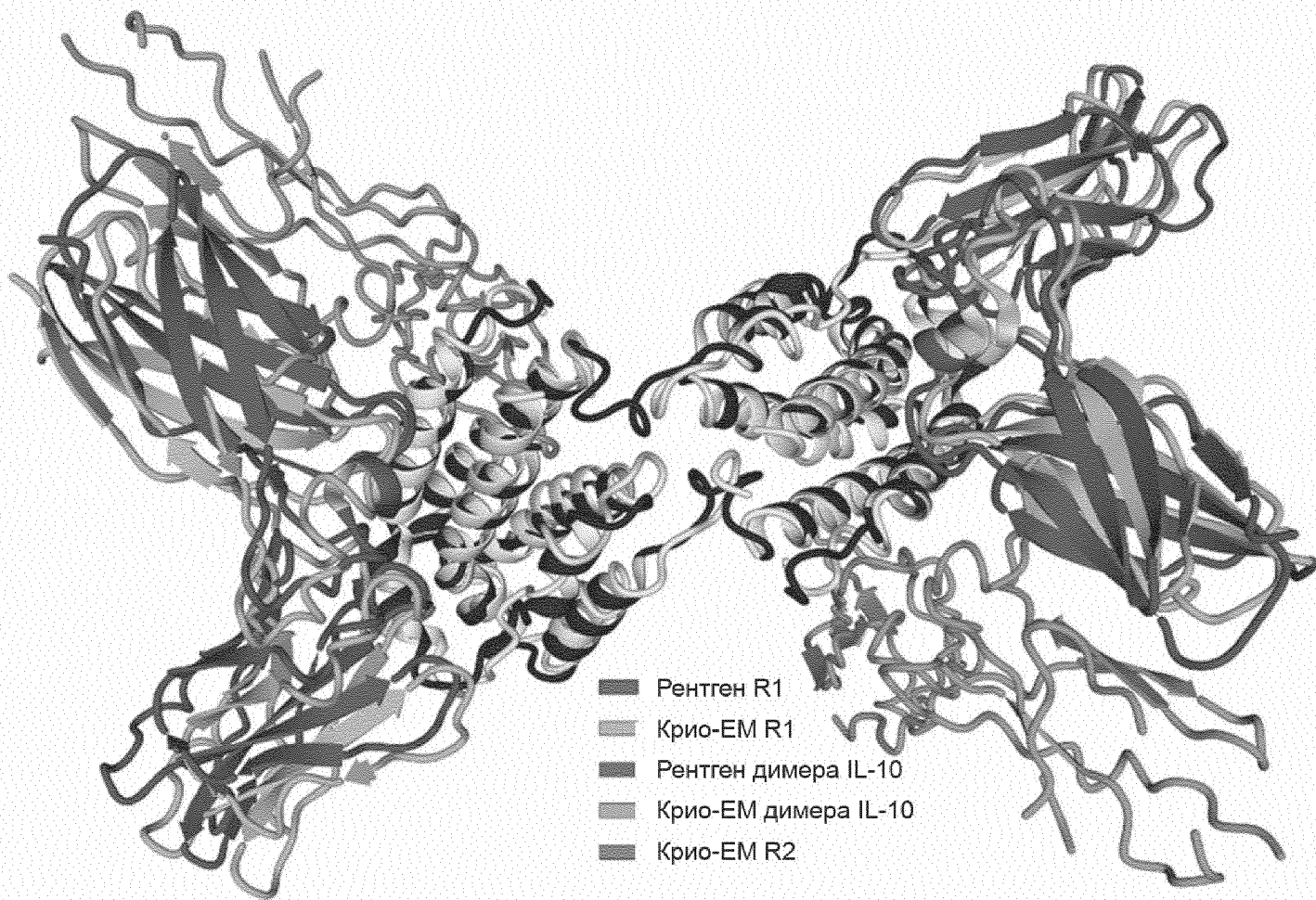
Фиг. 14

IL-10 человека	1	SPGGGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNILLKESLLEDFKGYL
IL-10 мыши	1	SRGOYSREDNNCTHFPVGOHMLLELRTAFSQVKTFFQTKDQLDNILLTDSLMODFKGYL
IL-10 макака	1	SPGGGTQSENSCTRFPGNLPHMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNILLKESLLEDFKGYL
IL-10 курицы	1	LEPTCLHFSELLPARLRELVRVKFEIKDYFOSRDDELNIQLLSSELLDEFKGTFGCQSVS
IL-10 морской свинки	1	SQGTNTQSEDSCAHFPAGLPHMLRELRAAFGRVKTFQTKDQLDNVLLNKSLLEDFKGYL
IL-10 данио рерио	1	RRVECKTDCCSFVEGFPLRLRELRSAYKEIQKFYESNDDLEPLLNEEDIKHNINSPYGCHV

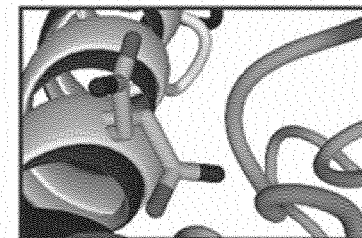
IL-10 человека	61	GCQALSEMIOFYLEEVMPQAEHQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRLRRCHRFLPCENKSKA
IL-10 мыши	61	GCQALSEMIOFYLVVEMVPOAEKHGPEIKEHLNSLGEKLLKTLRMRLRRCHRFLPCENKSKA
IL-10 макака	61	GCQALSEMIOFYLEEVMPQAEHQDPDIKEHVNSLGENLKTLLRRLRRLRRCHRFLPCENKSKA
IL-10 курицы	61	EMLRFYTDEVLPFRAMQTSTSHQOSMGDLGNMMLLGLKATMRRCHRFFTCCKRSKAIKQIKE
IL-10 морской свинки	61	GCQALSEMIOFYLVVEMVPOAEKHGPEIKEHLNSLGEKLLKTLRMRLRRCHRFLPCENKSKA
IL-10 данио рерио	61	MNEILHFYLETILPTALQKNPLKHSTTPIDSIGNIFQELKRDVVKCKRYFSCQNPFEVNS

IL-10 человека	121	VEQVKNAFENKLOEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
IL-10 мыши	121	VEQVKSDFNKLODQGVYKAMNEFDIFINCI EAYMMIKMKS
IL-10 макака	121	VEQVKNAFENKLOEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIQN
IL-10 курицы	121	TFEKMDENGIYKAMGEFDIFINYIEEYLLMRRRK-----
IL-10 морской свинки	121	VEQVKSDFNKLODQGVYKAMNEFDIFINCI EAYMMIKMKS
IL-10 данио рерио	121	LKNSYEKMKKEKGVYKAMGELDLLFRYIEQYLAISKRVKH--

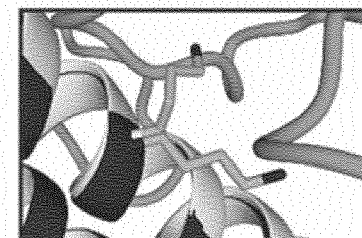
Фиг. 15



Asn19

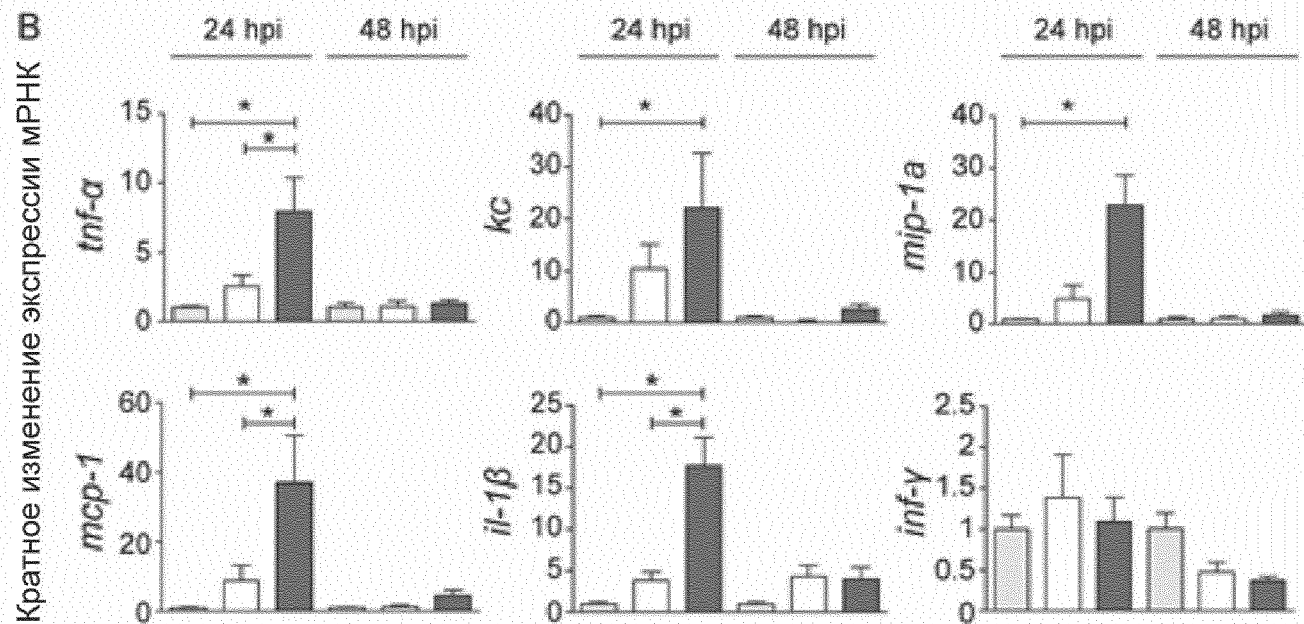
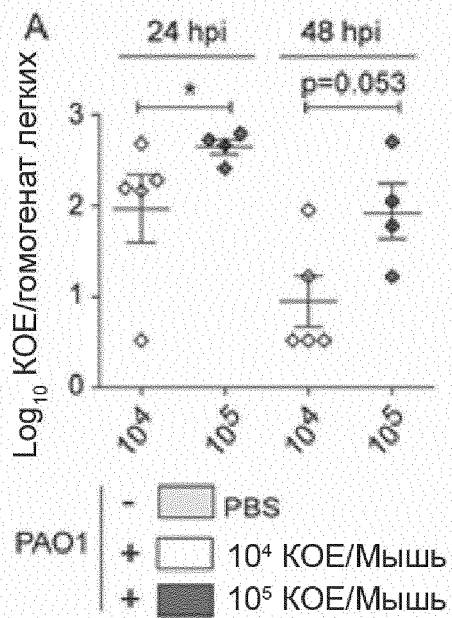


Asn92



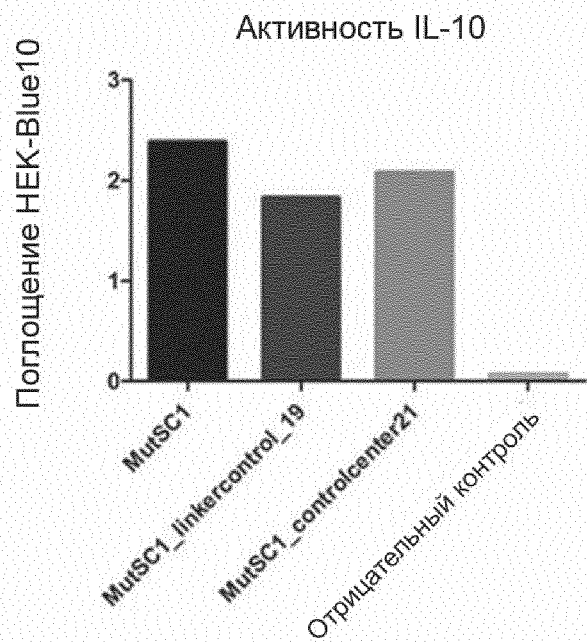
Lys99

Фиг. 16

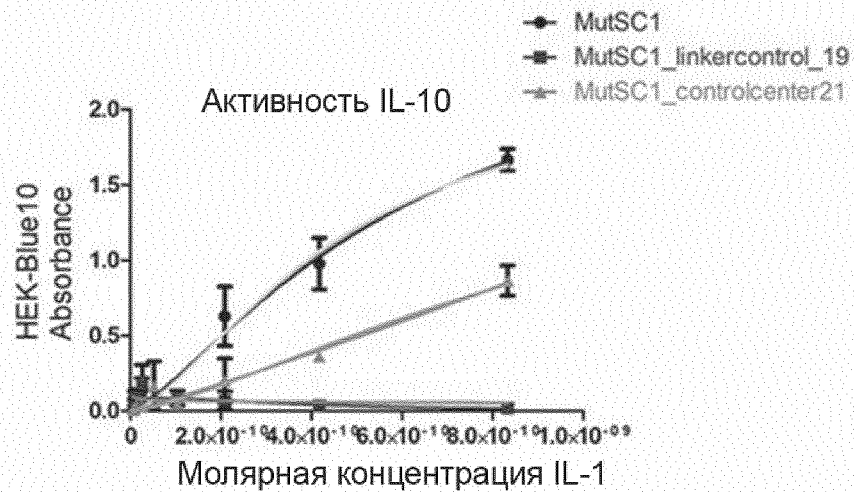


ФИГ. 17

A

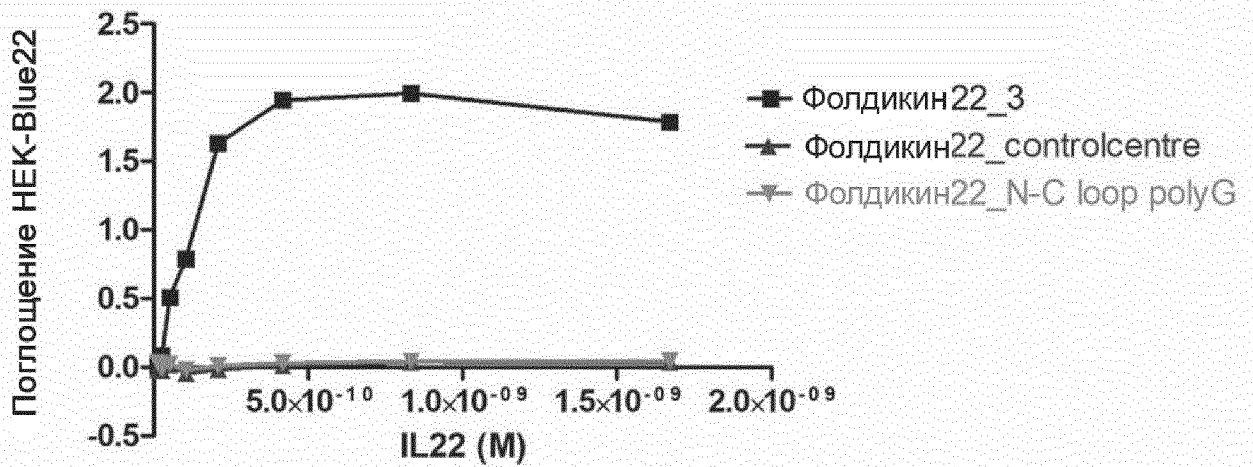


B

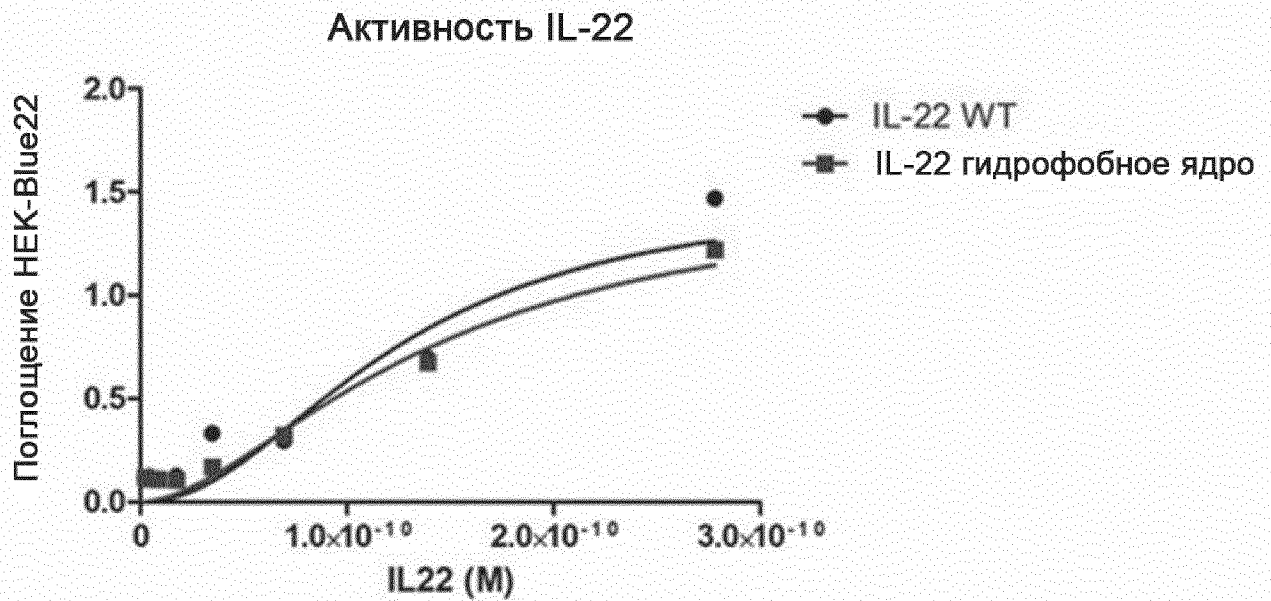


	MutSC1	MutSC1_linkercontrol_19	MutSC1_controlcenter21
Константа Хилла	1.53	-	1.38
KD	4.65e-10	Нет активности	1.24e-09

Фиг. 18



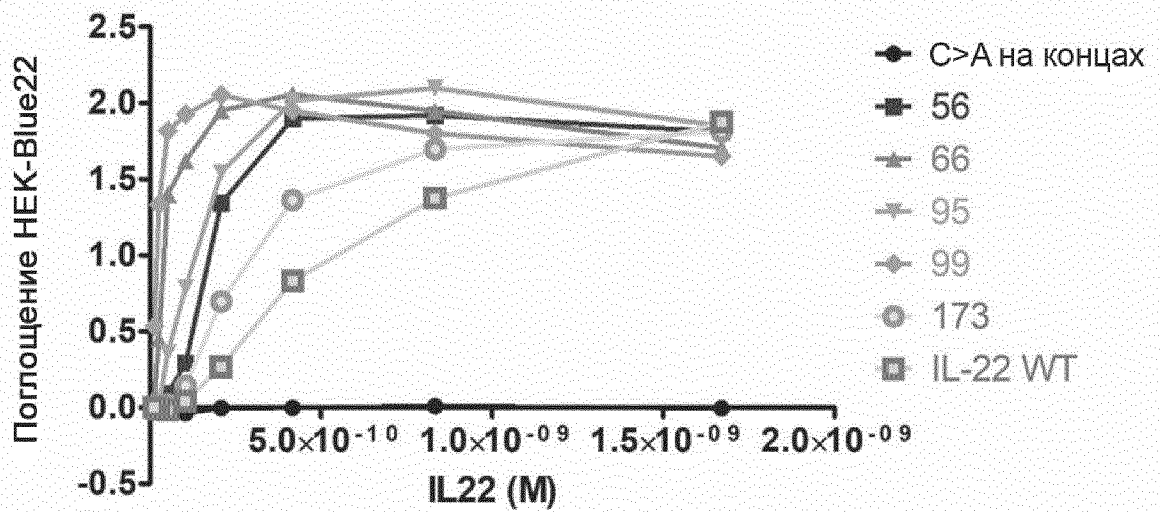
Фиг. 19



ID	IL22	IL-22 гидрофобное ядро
Кажущаяся K_D	1.17E-11	5.40E-12

2-кратное увеличение

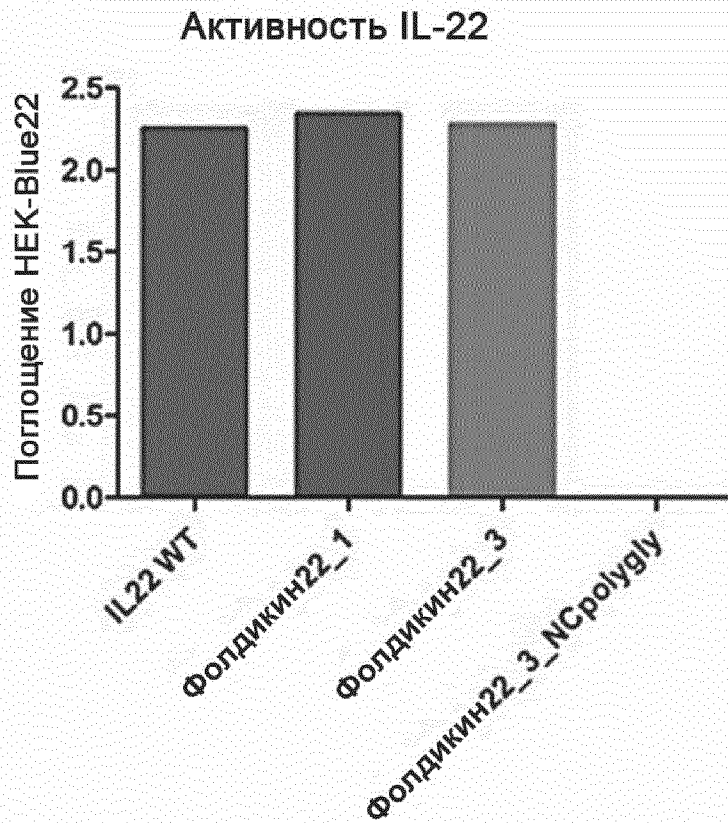
Фиг. 20



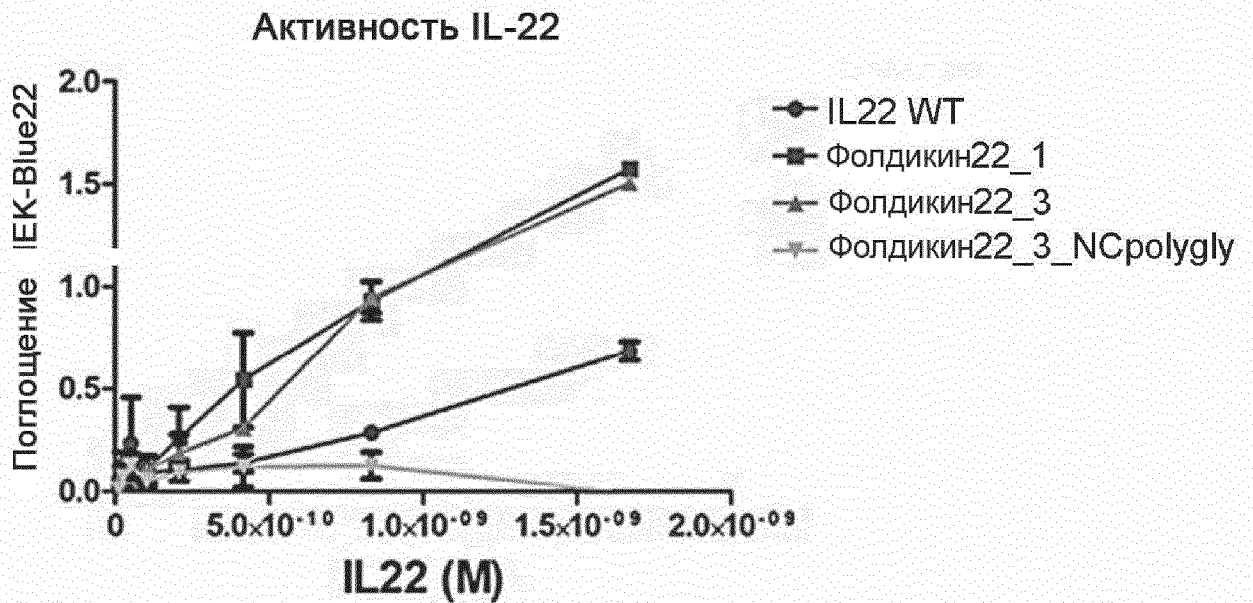
IL22 WT	56	66	95	99	173
1.3E-10	1.16E-10	1.19E-11	5.3E-11	9.5E-12	3.1E-10

Фиг. 21

A

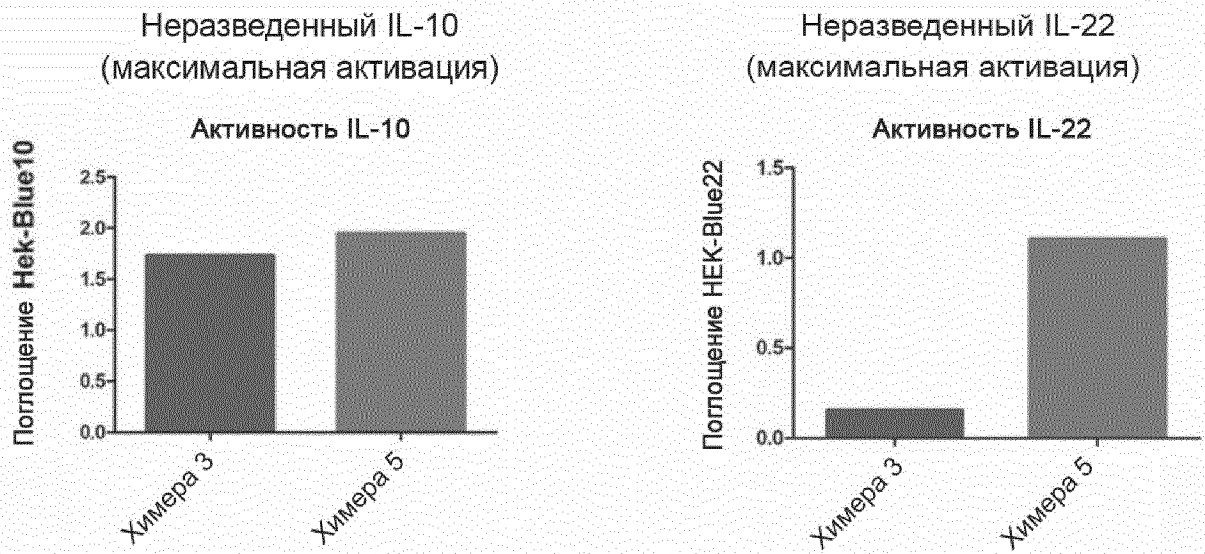


B

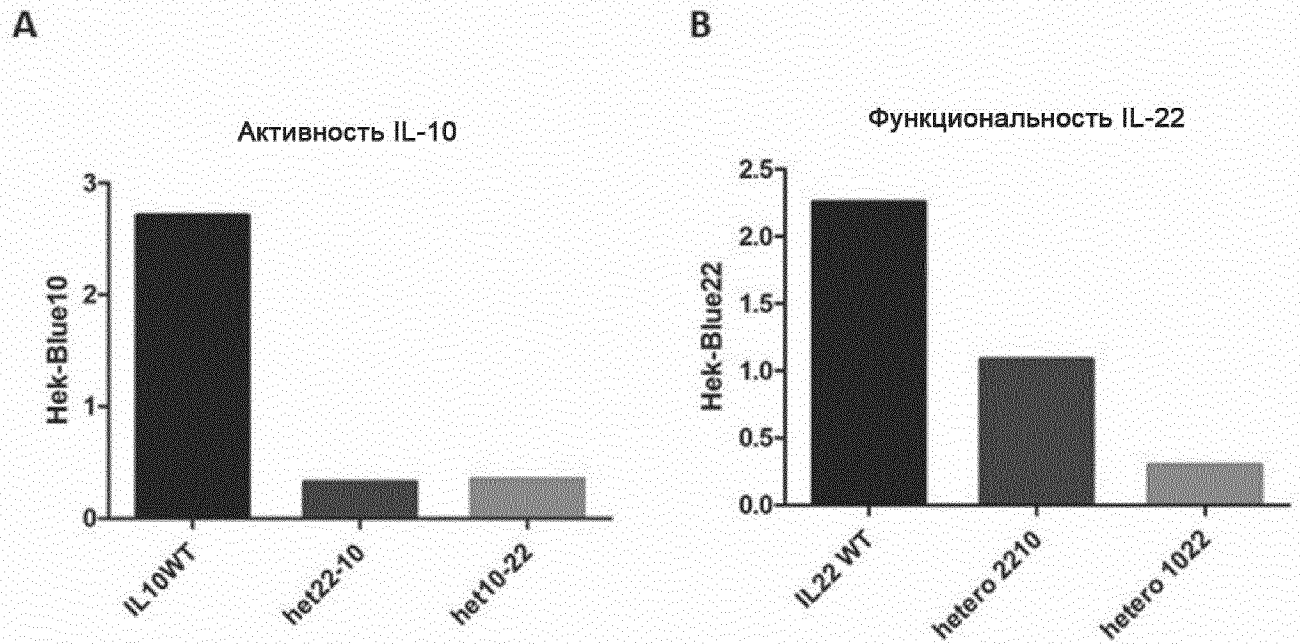


ID	IL22	Фолдикин22_1	Фолдикин22_3	Фолдикин22_3_NCpolygly
Кажущаяся KD	3.979e-009	9.450e-010	1.036e-009	

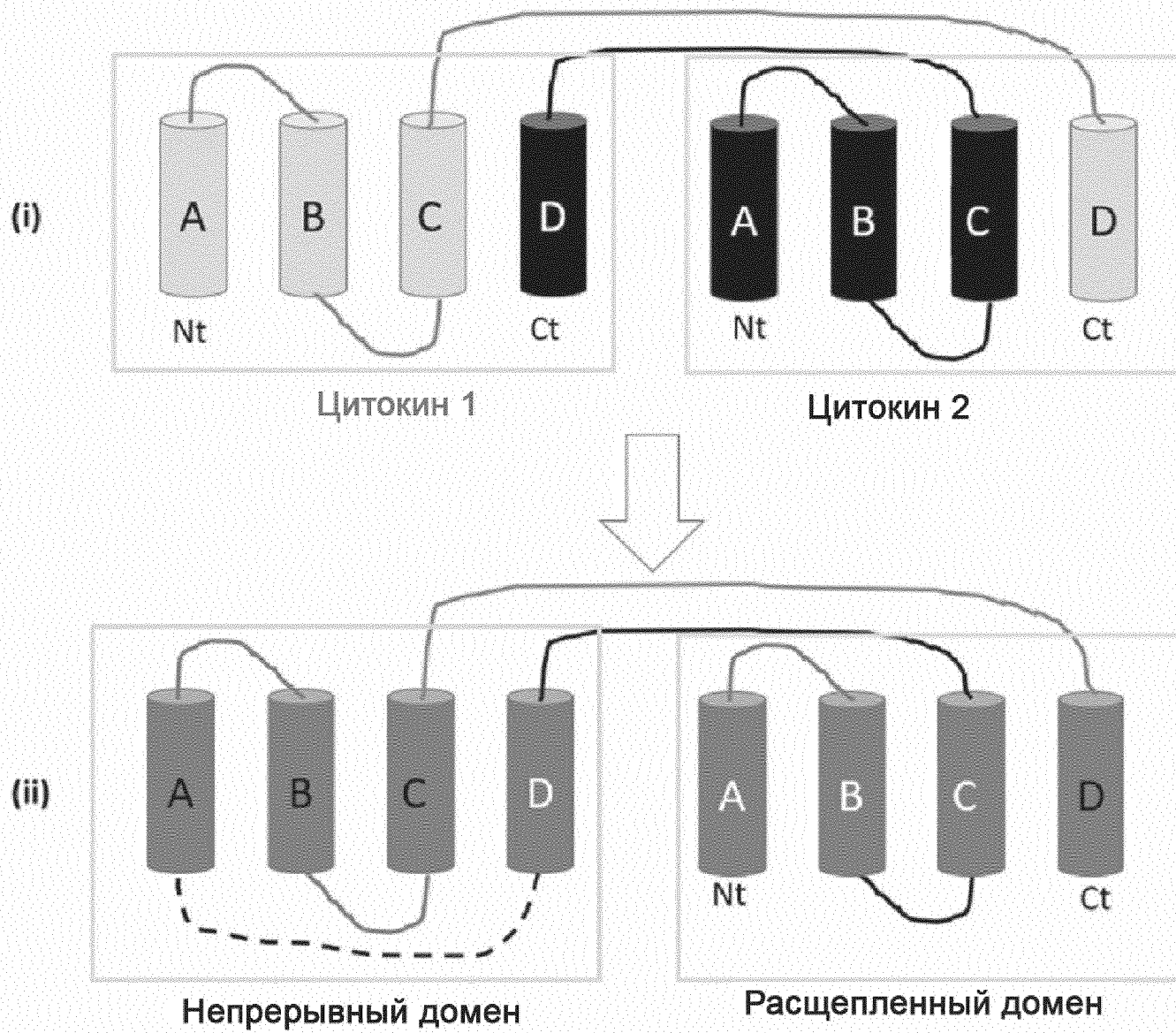
Фиг. 22



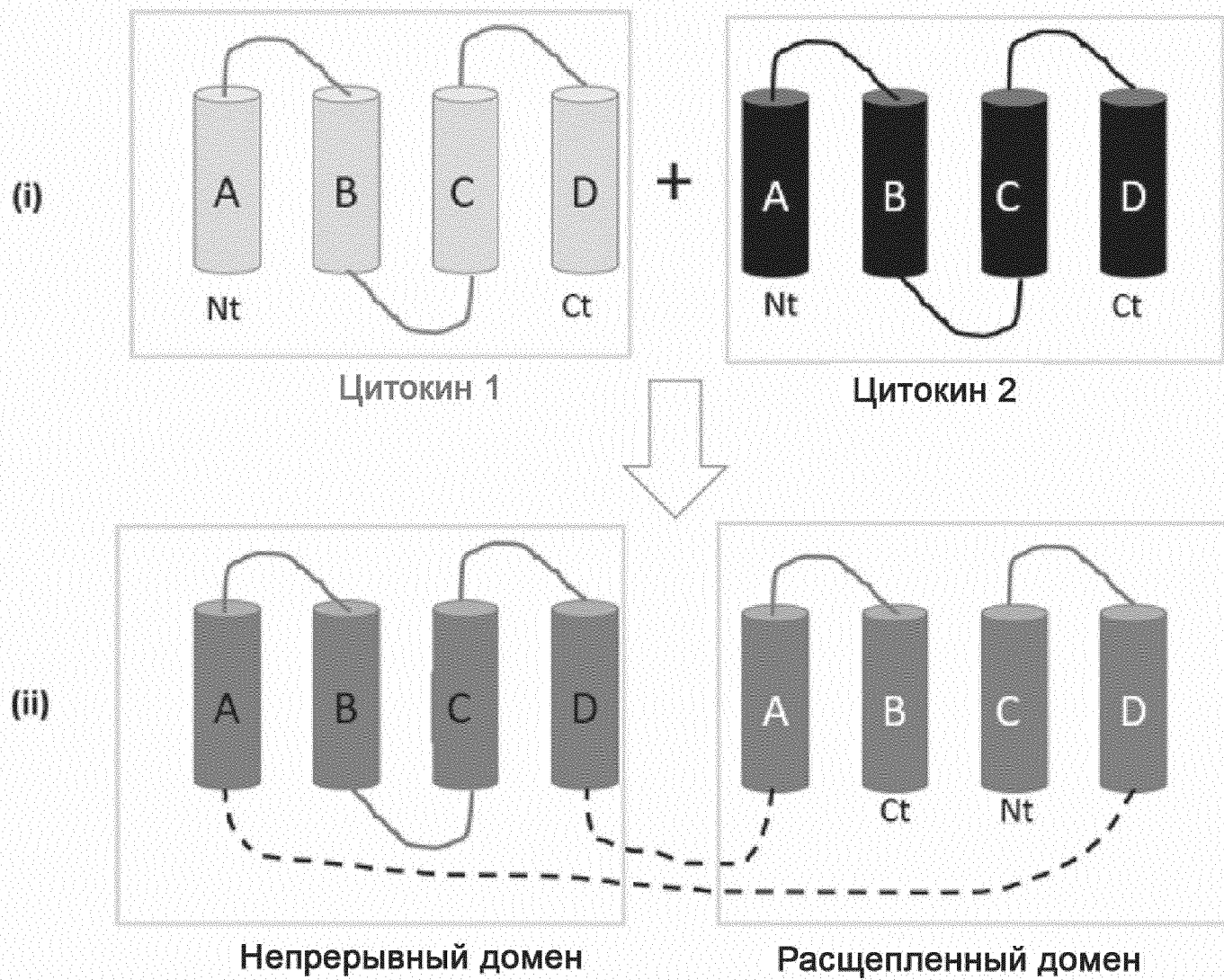
Фиг. 23



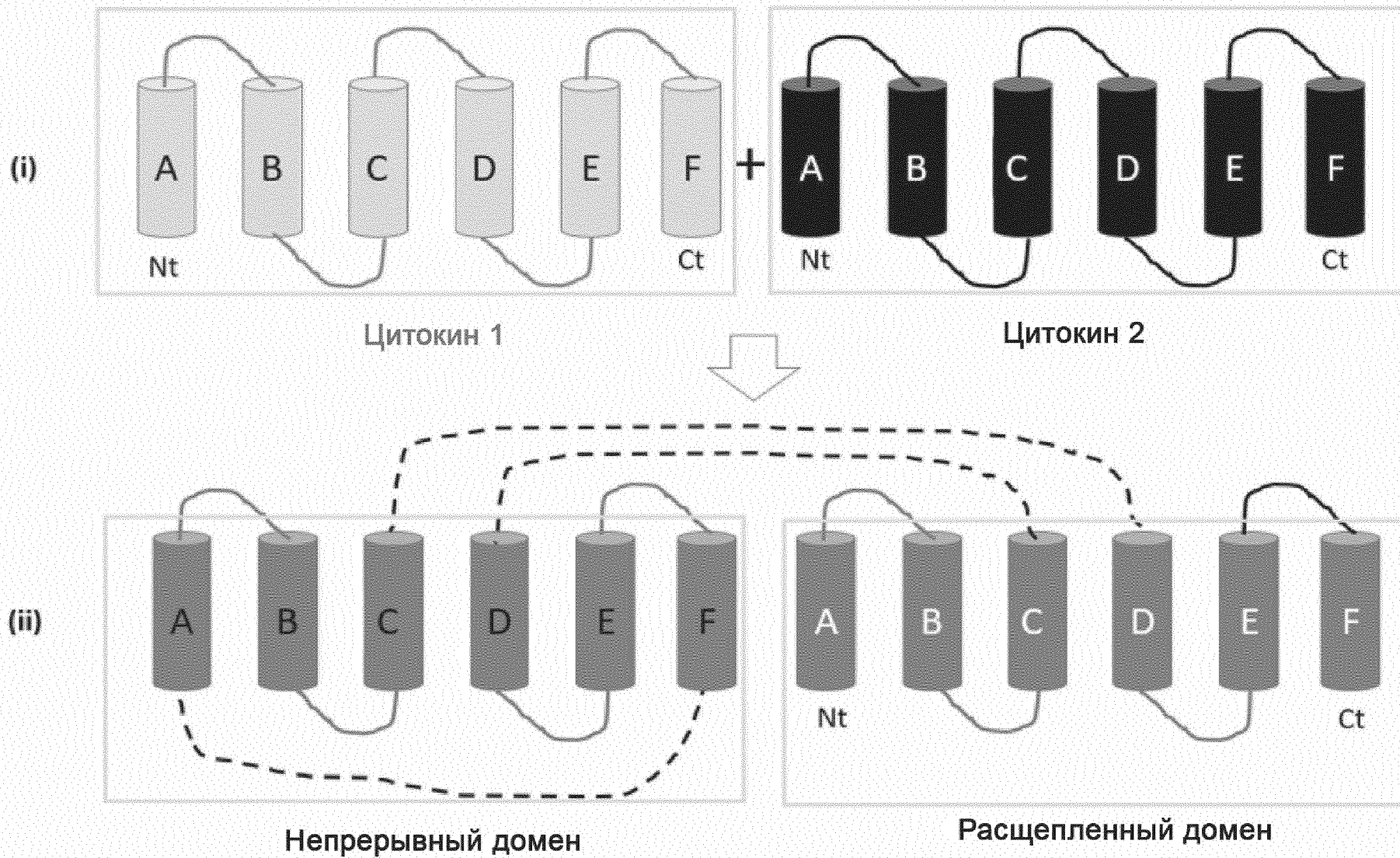
Фиг. 24



ФИГ. 25



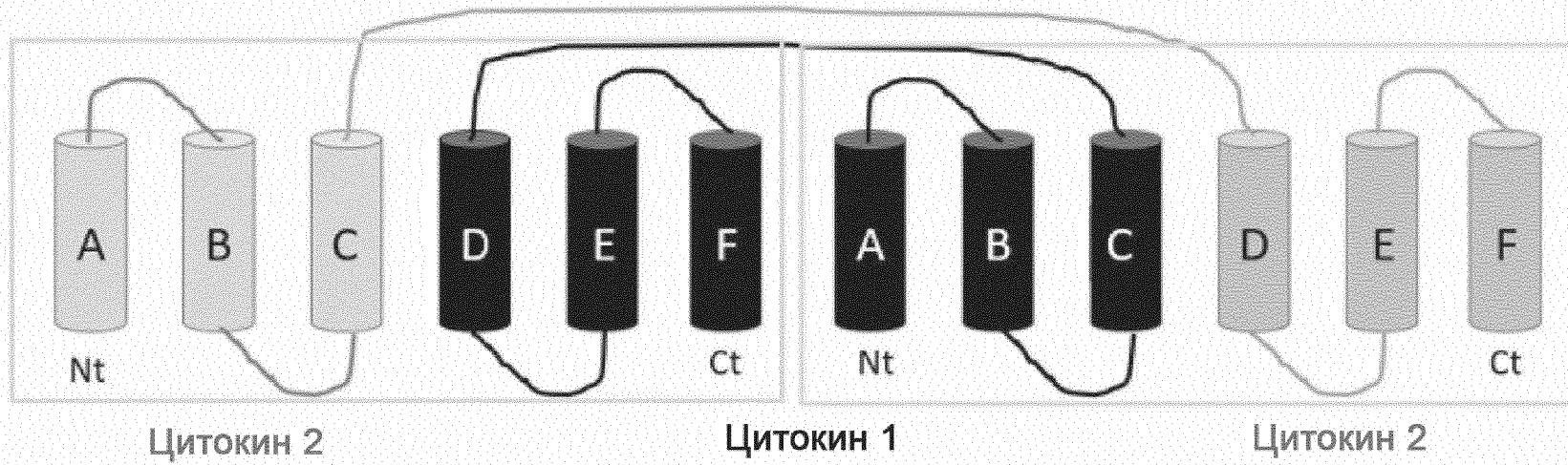
Фиг. 26



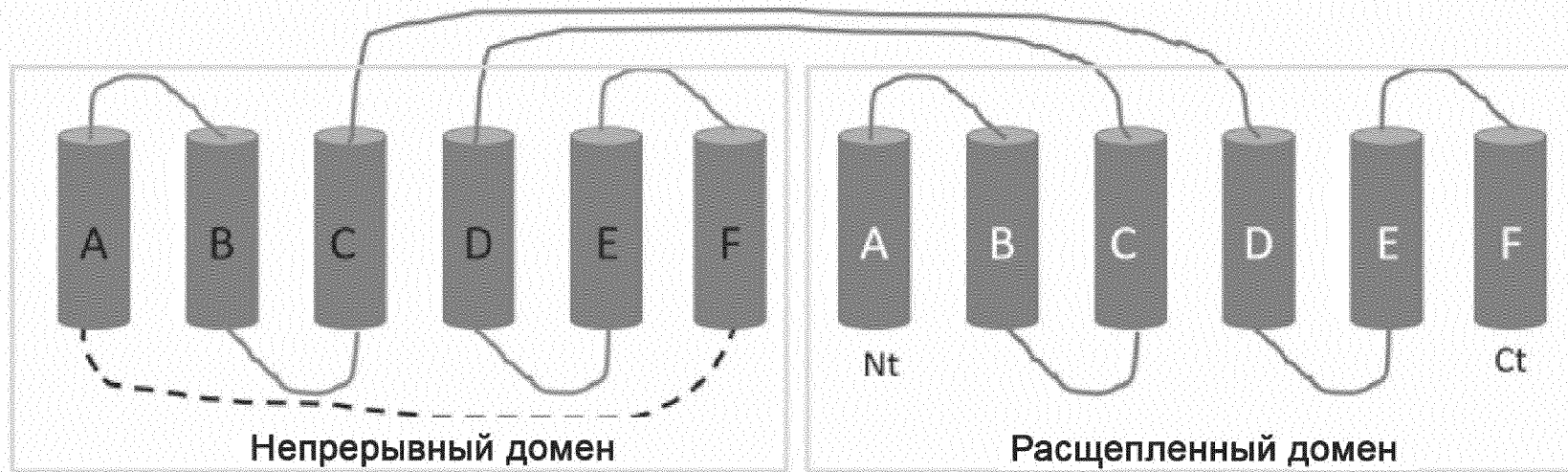
28/43

Фиг. 27

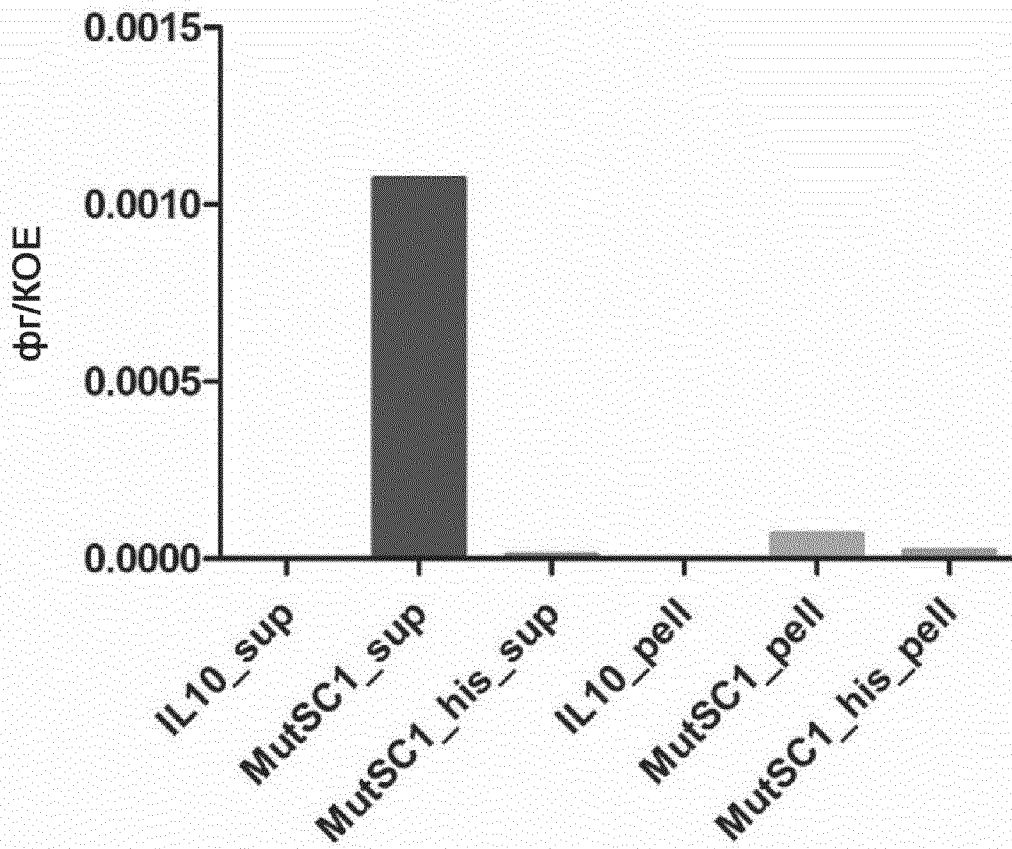
(i)



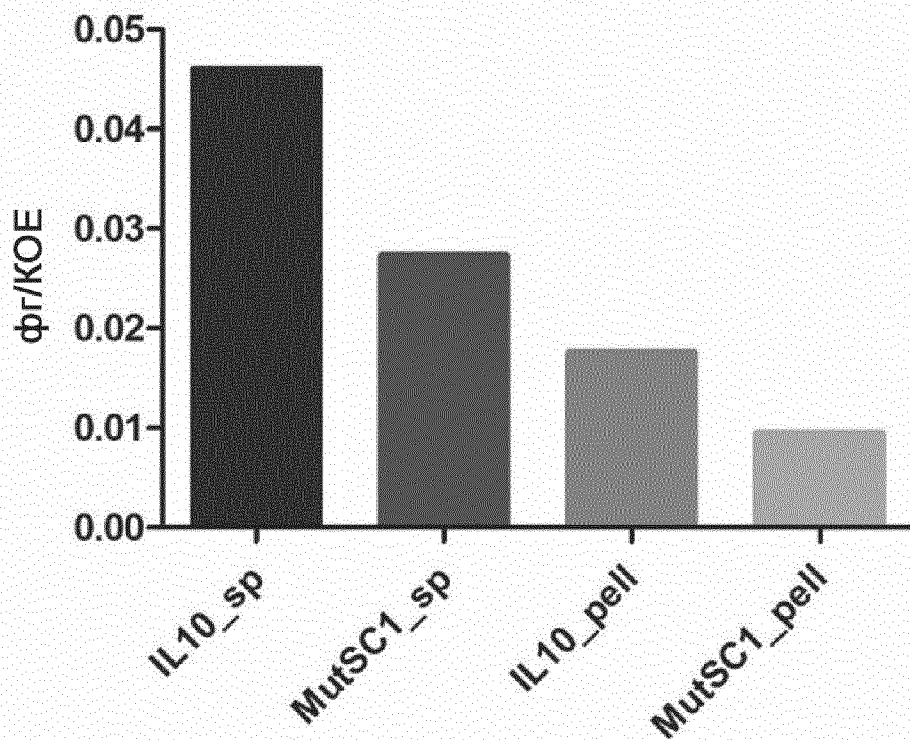
(ii)



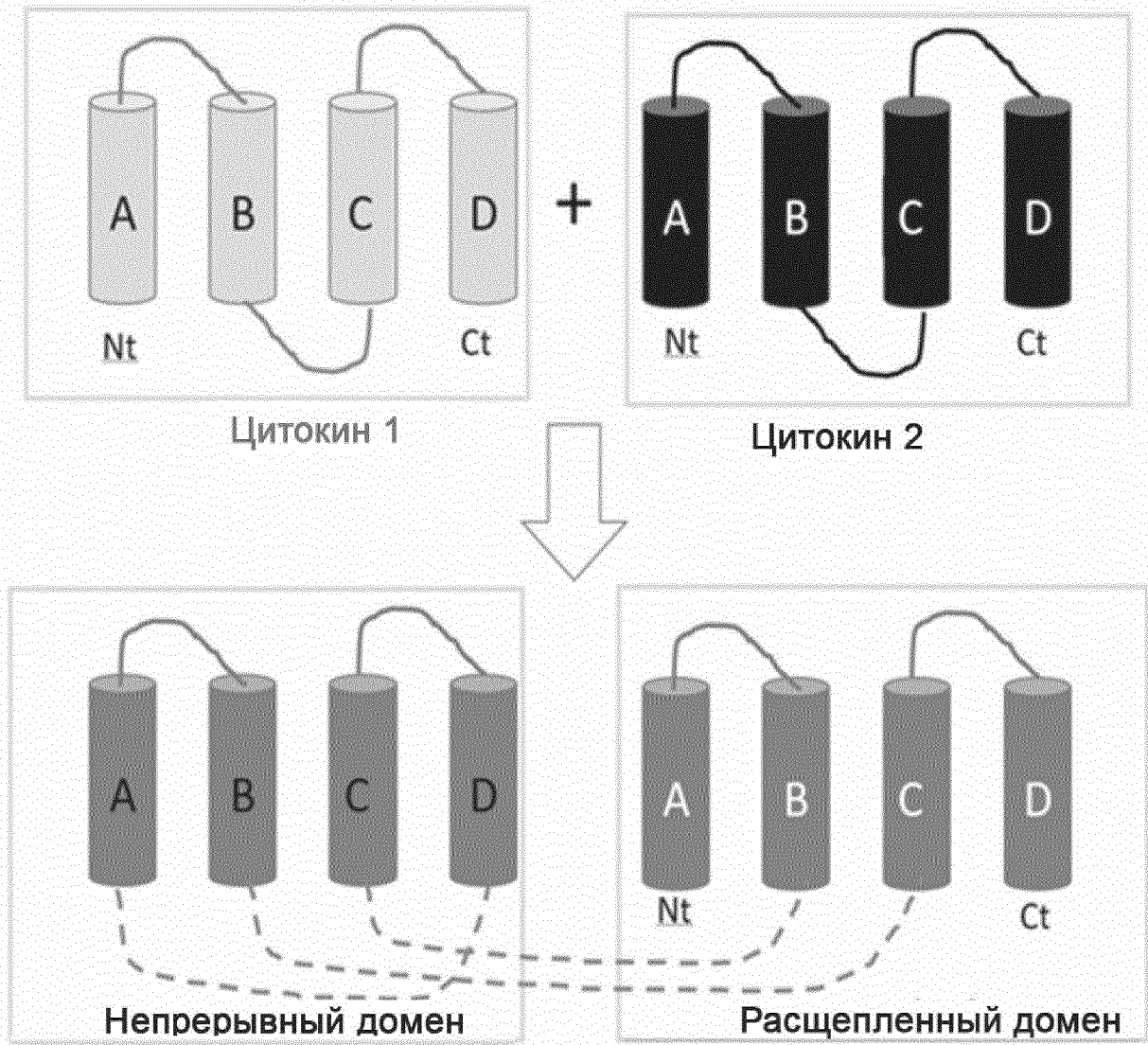
ФИГ. 28



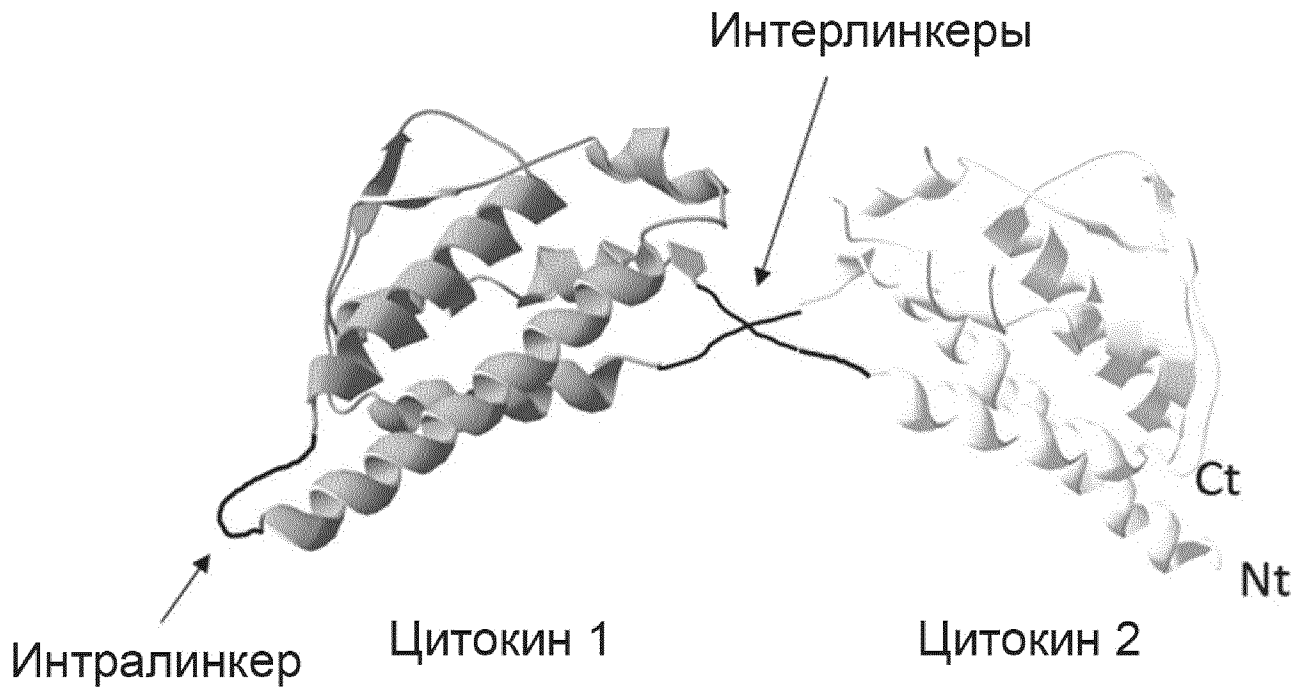
ФИГ. 29



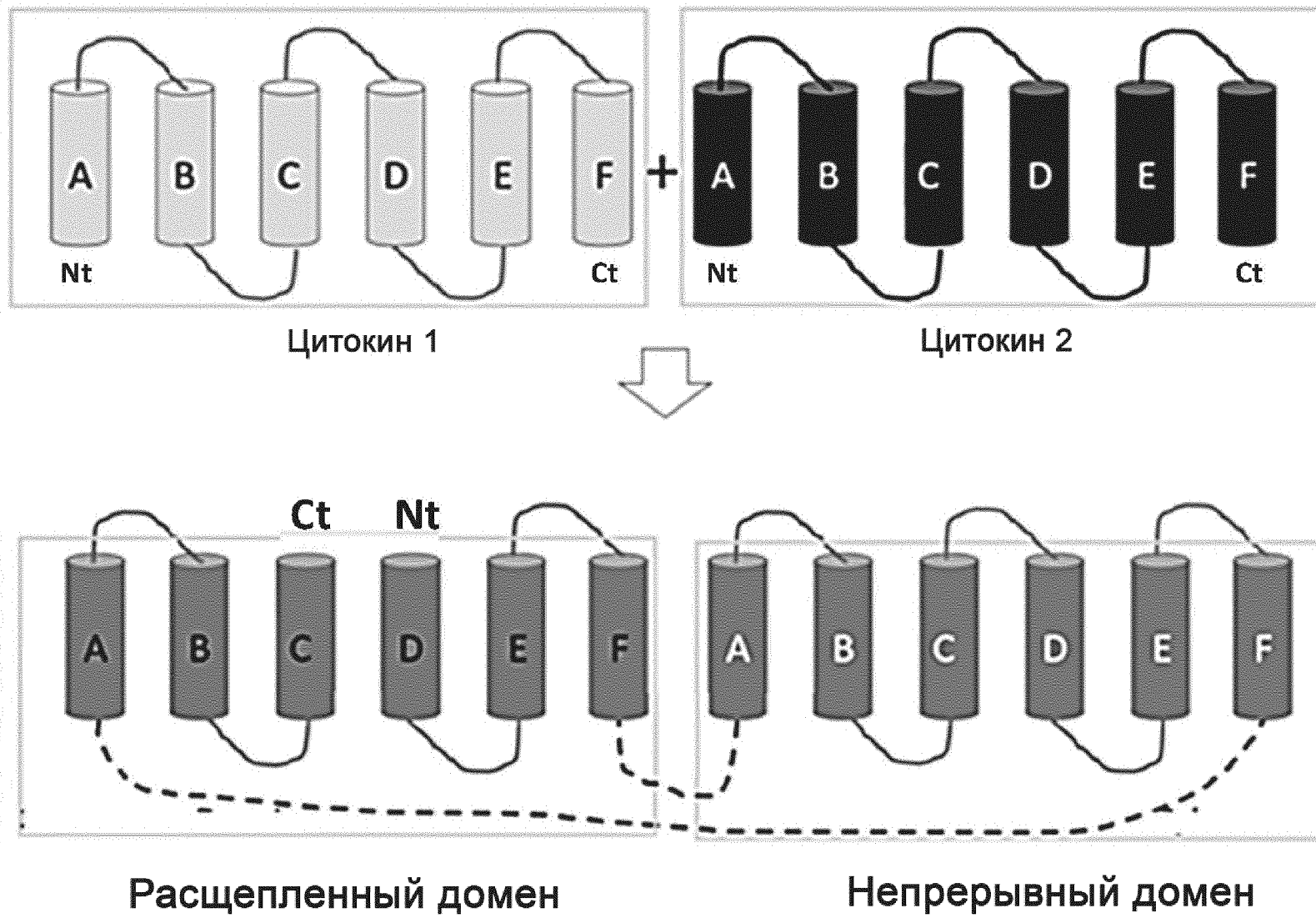
ФИГ. 30



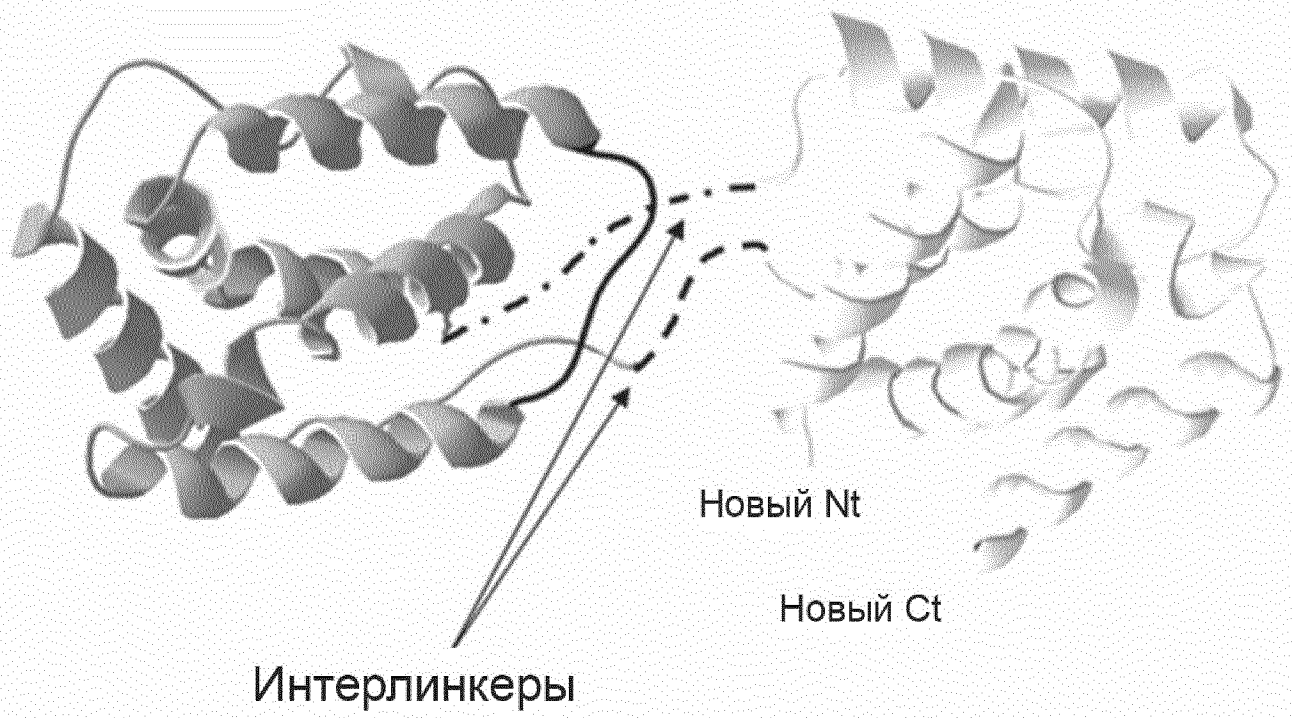
Фиг. 31



Фиг. 32

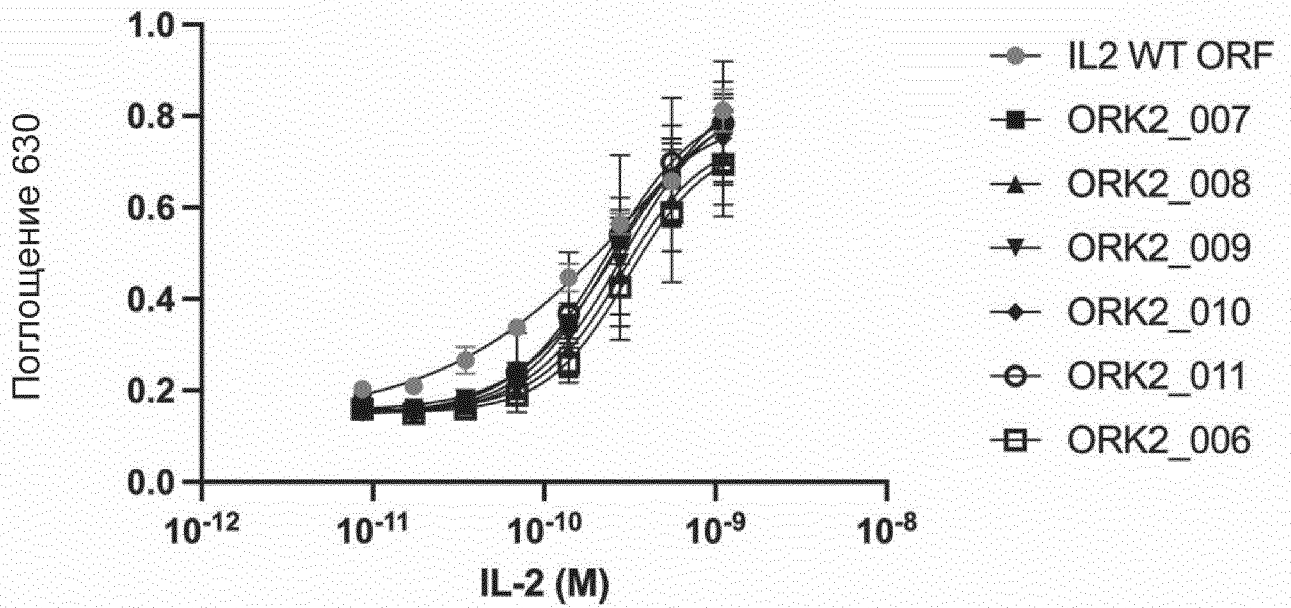


Фиг. 33



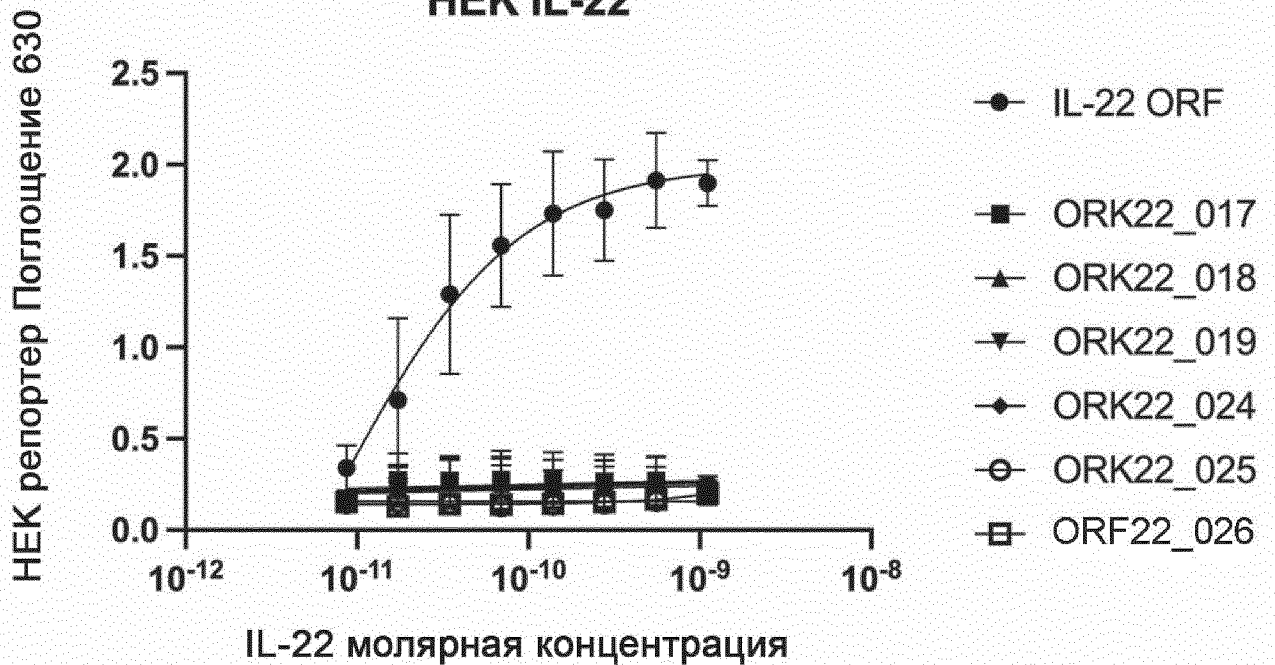
Фиг. 34

HEK репортер IL-10

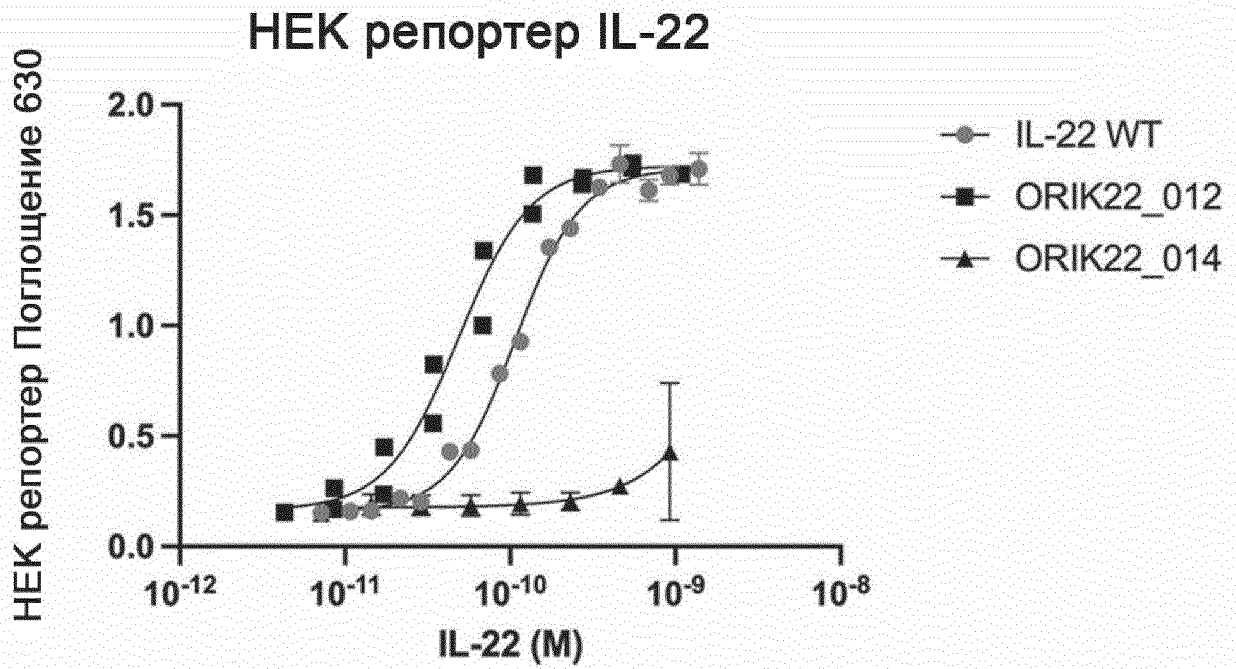


Фиг. 35

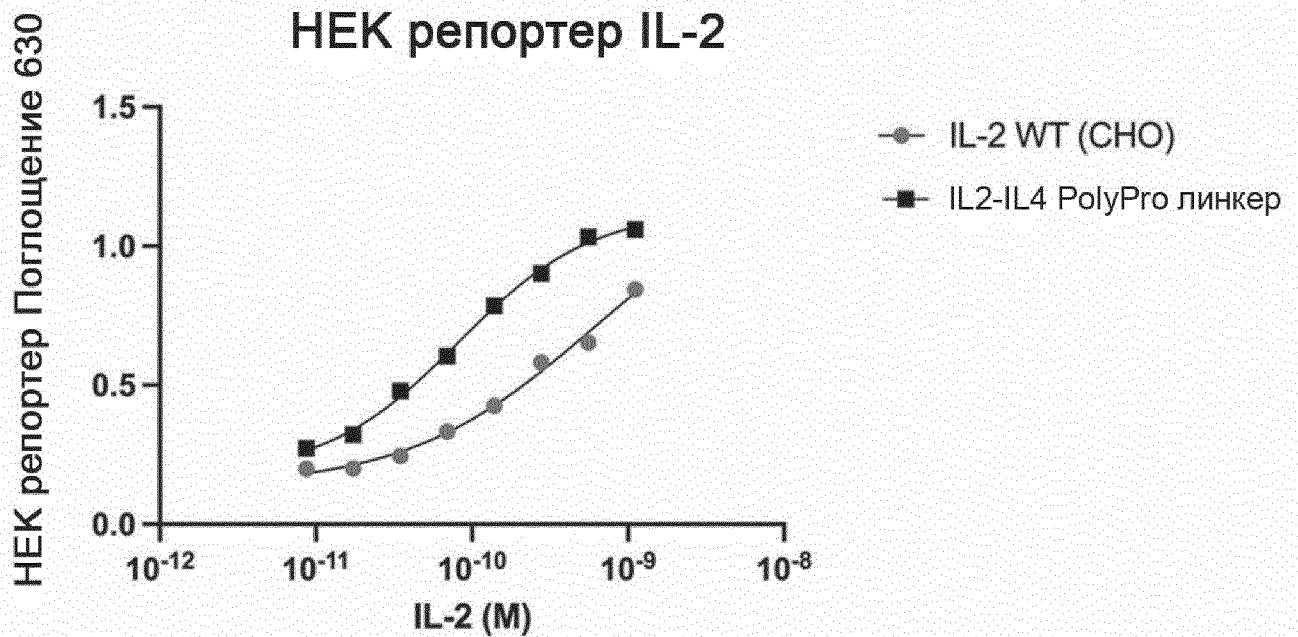
HEK IL-22



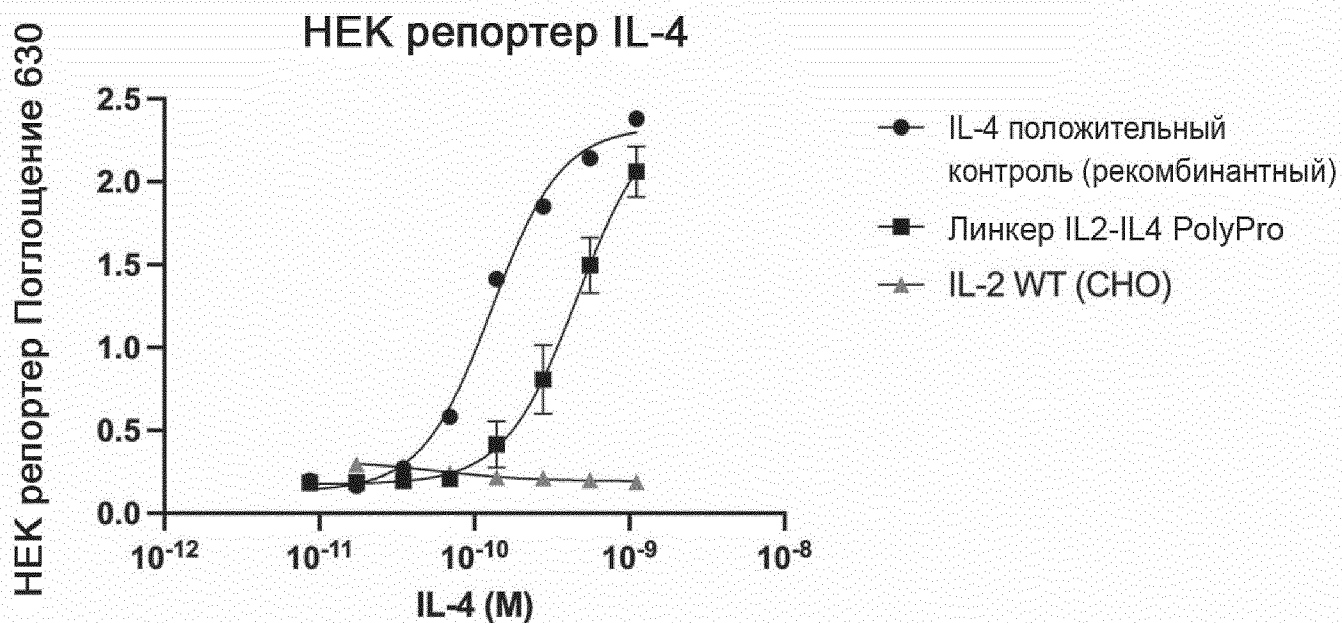
Фиг. 36



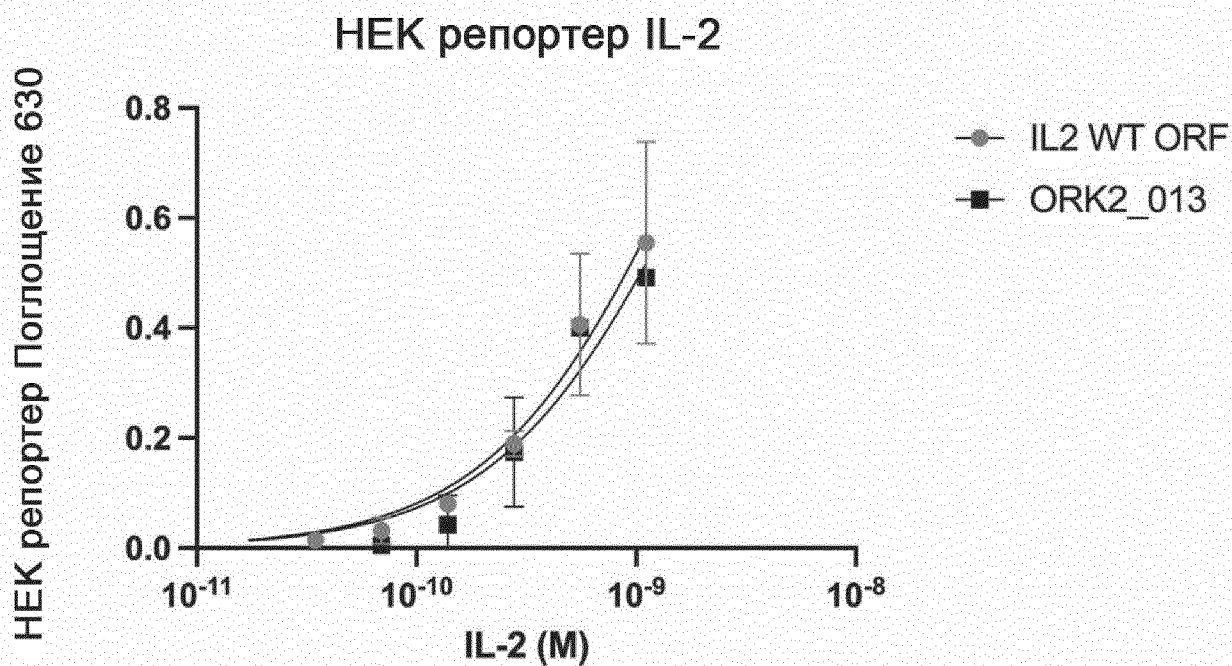
Фиг. 37



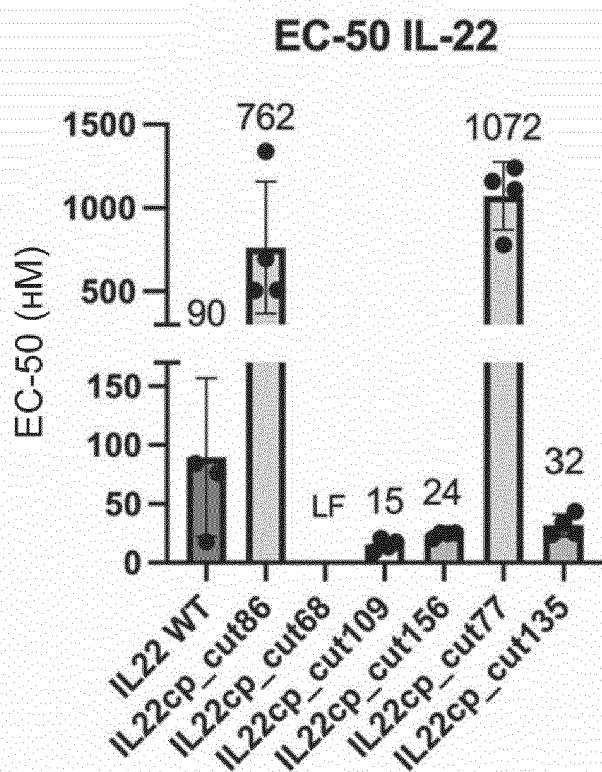
Фиг. 38



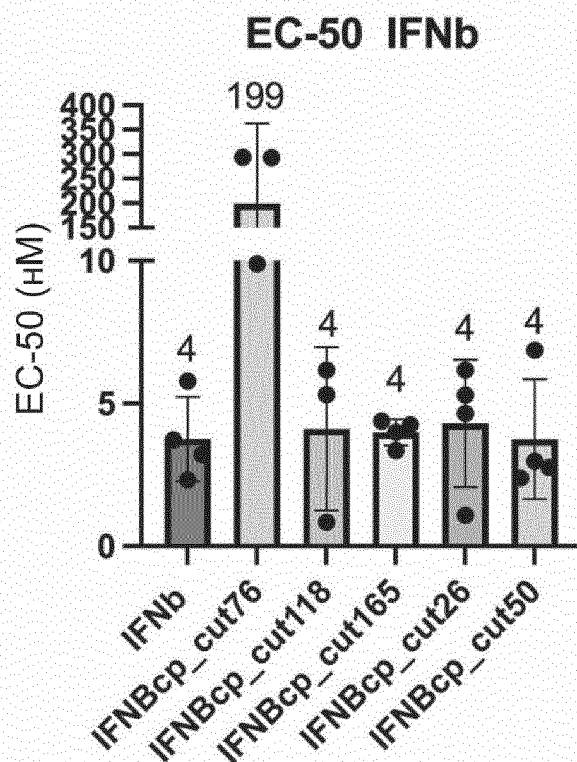
Фиг. 39



Фиг. 40

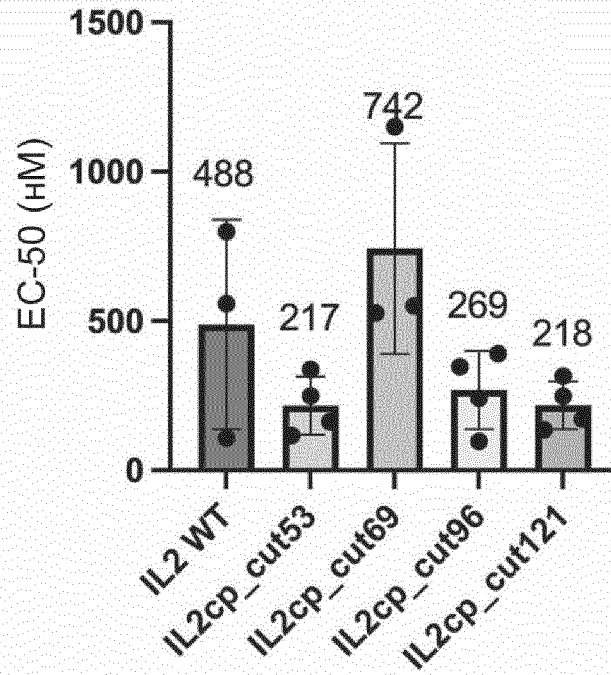


Фиг. 41

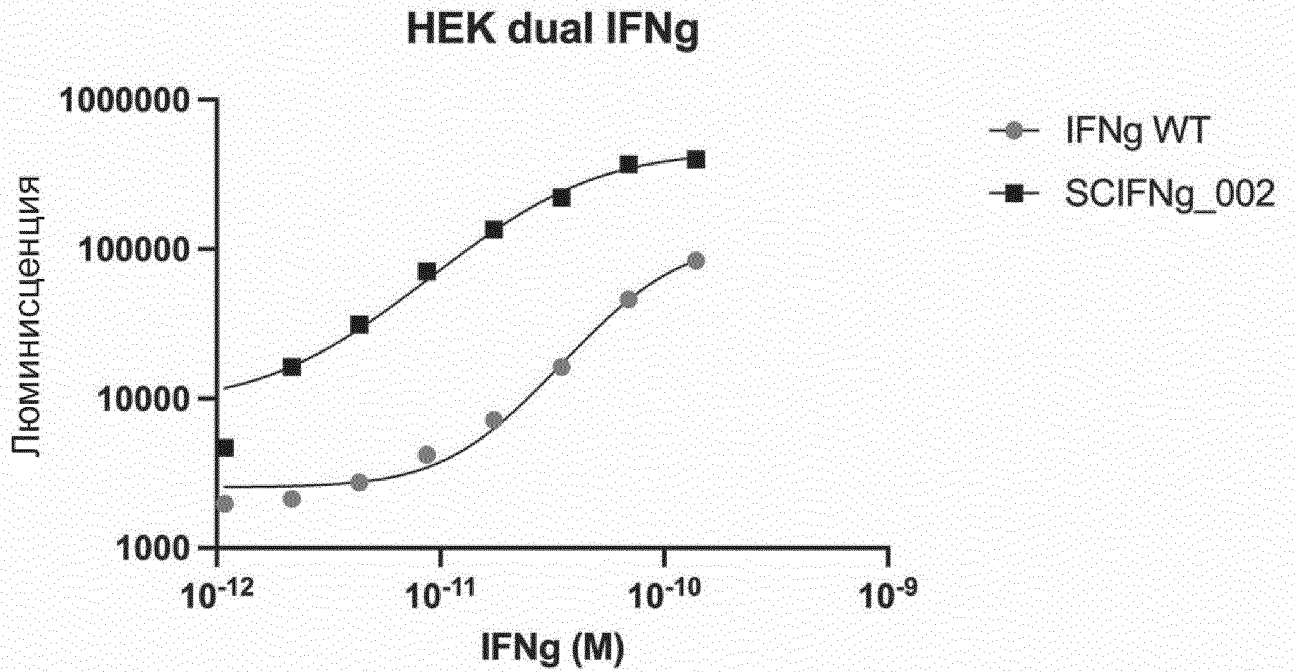


Фиг. 42

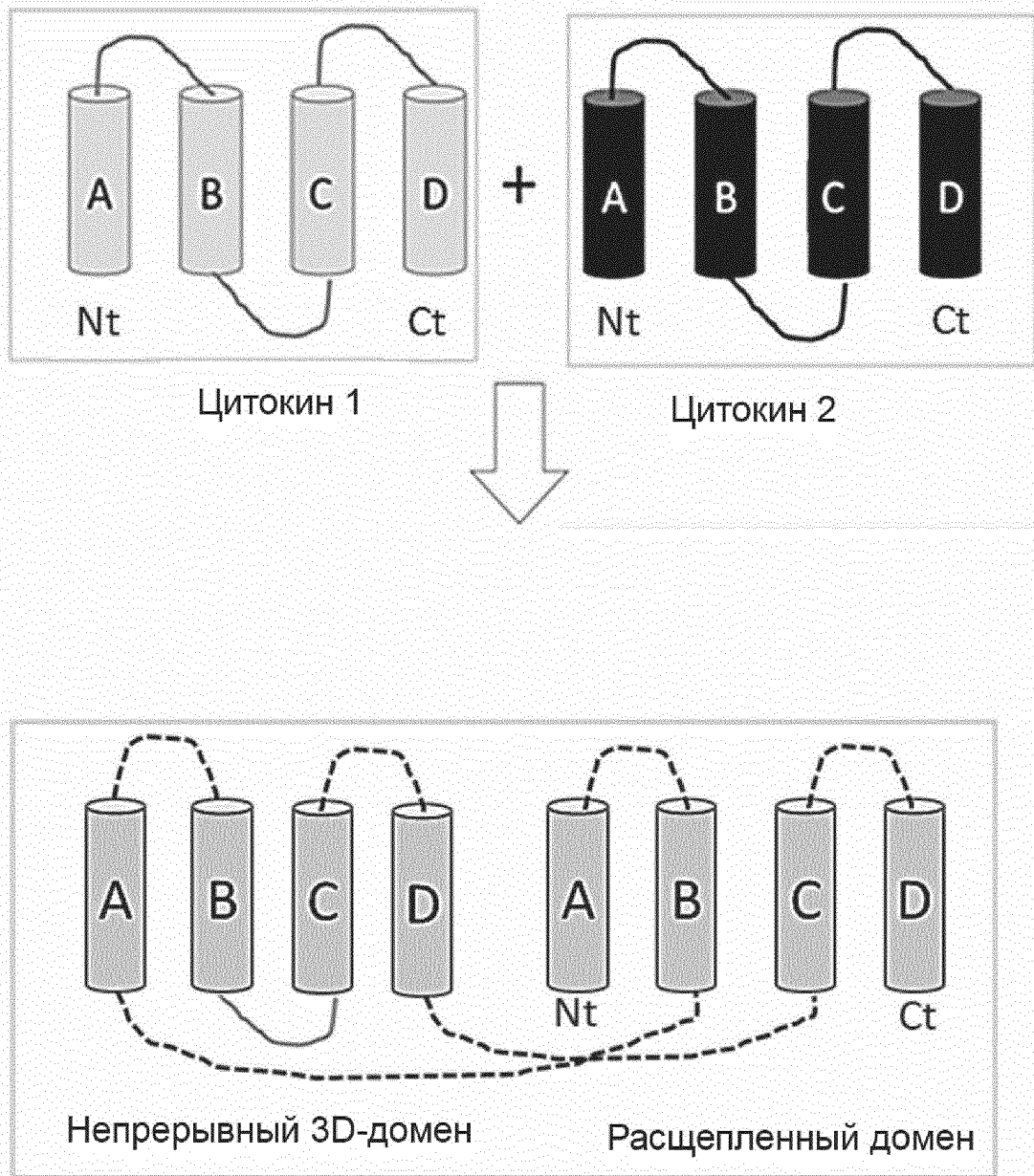
EC-50 IL-2



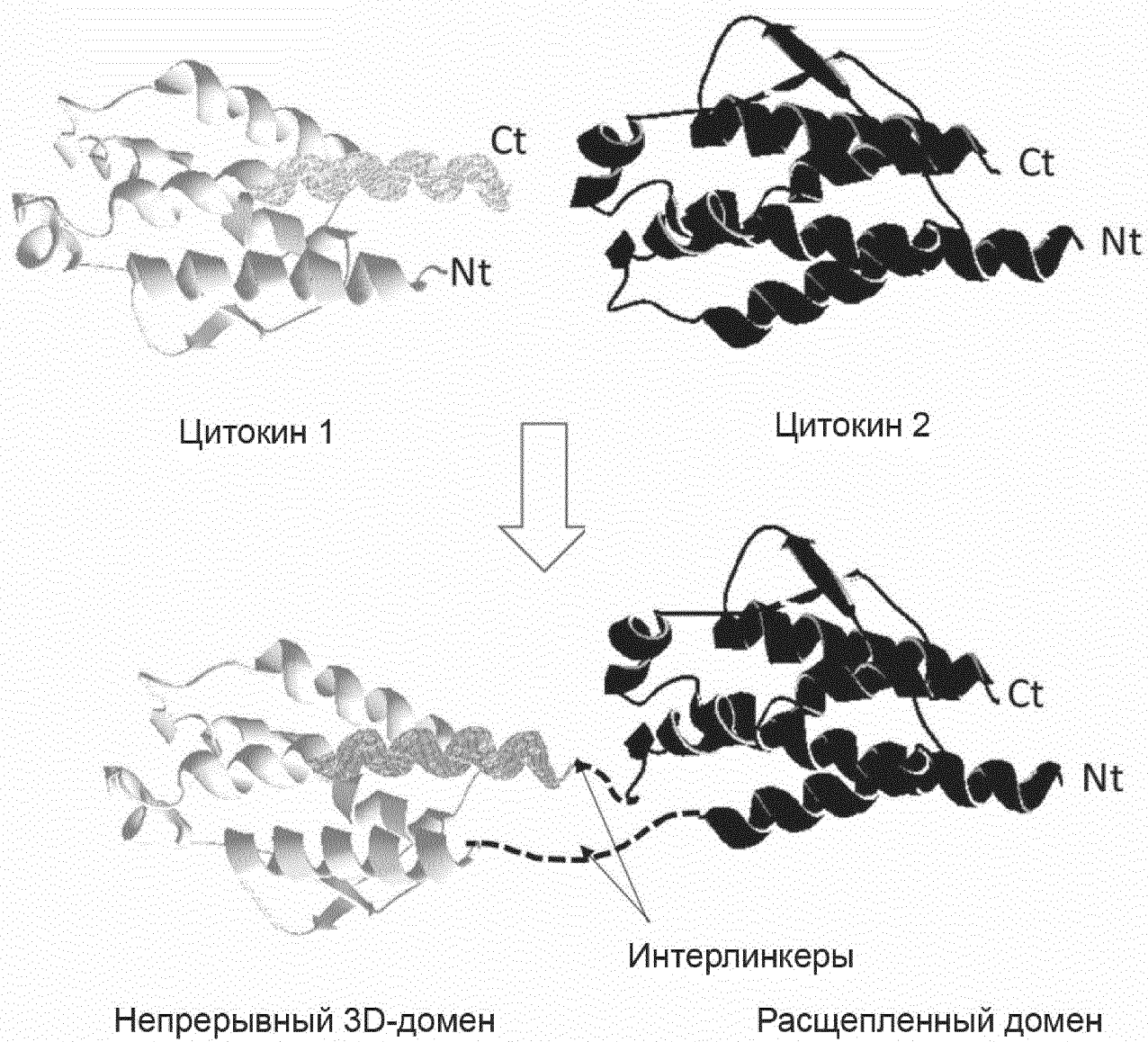
Фиг. 43



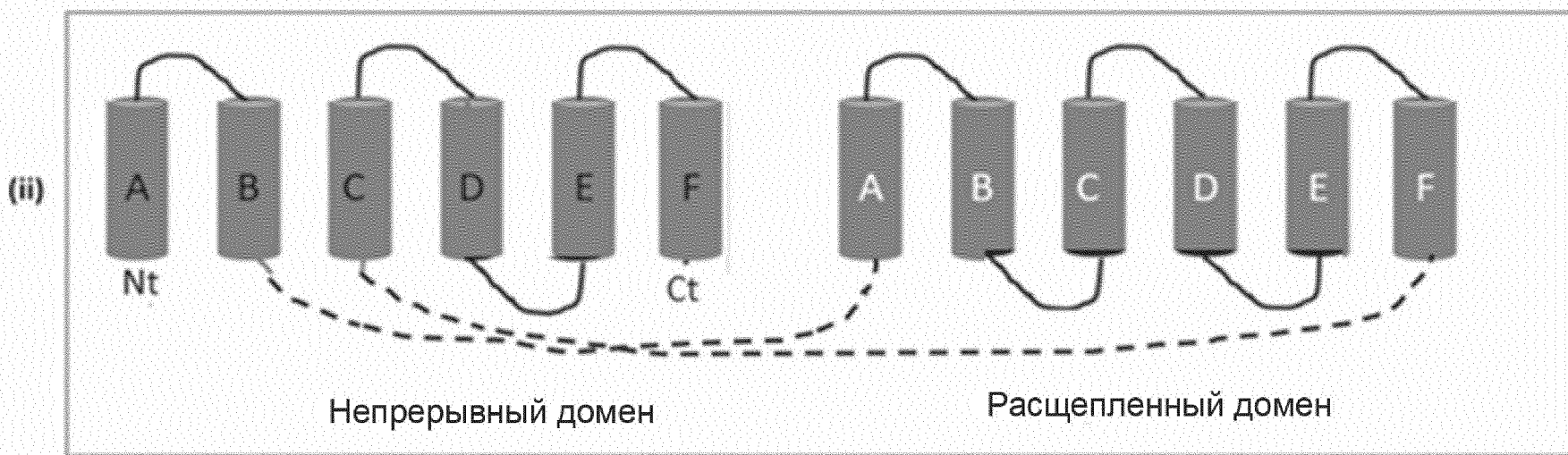
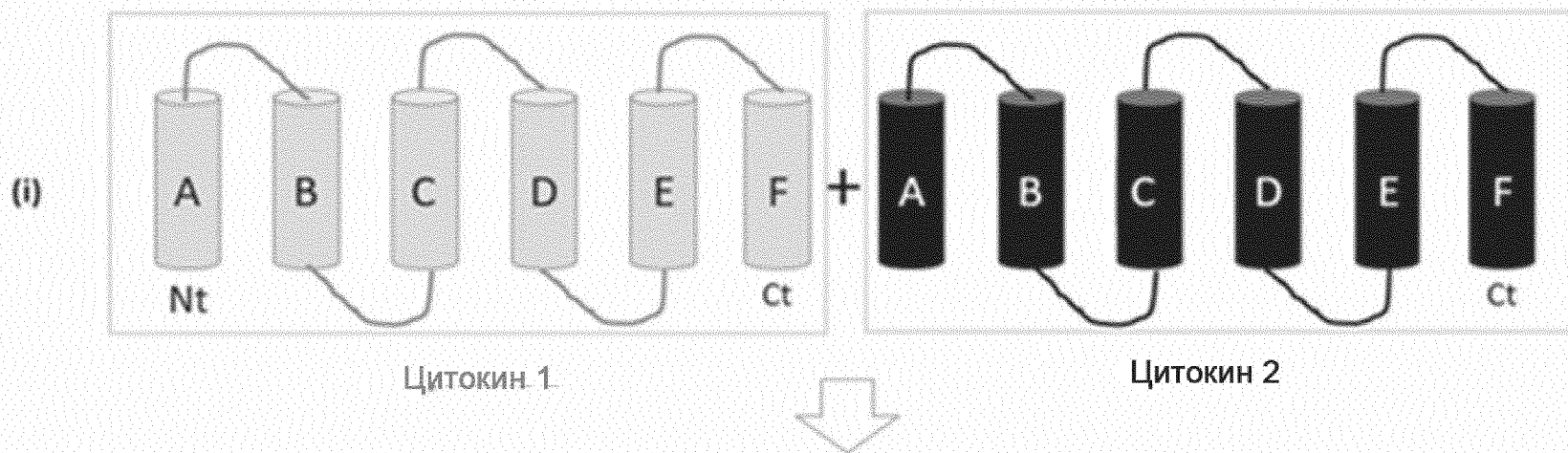
Фиг. 44



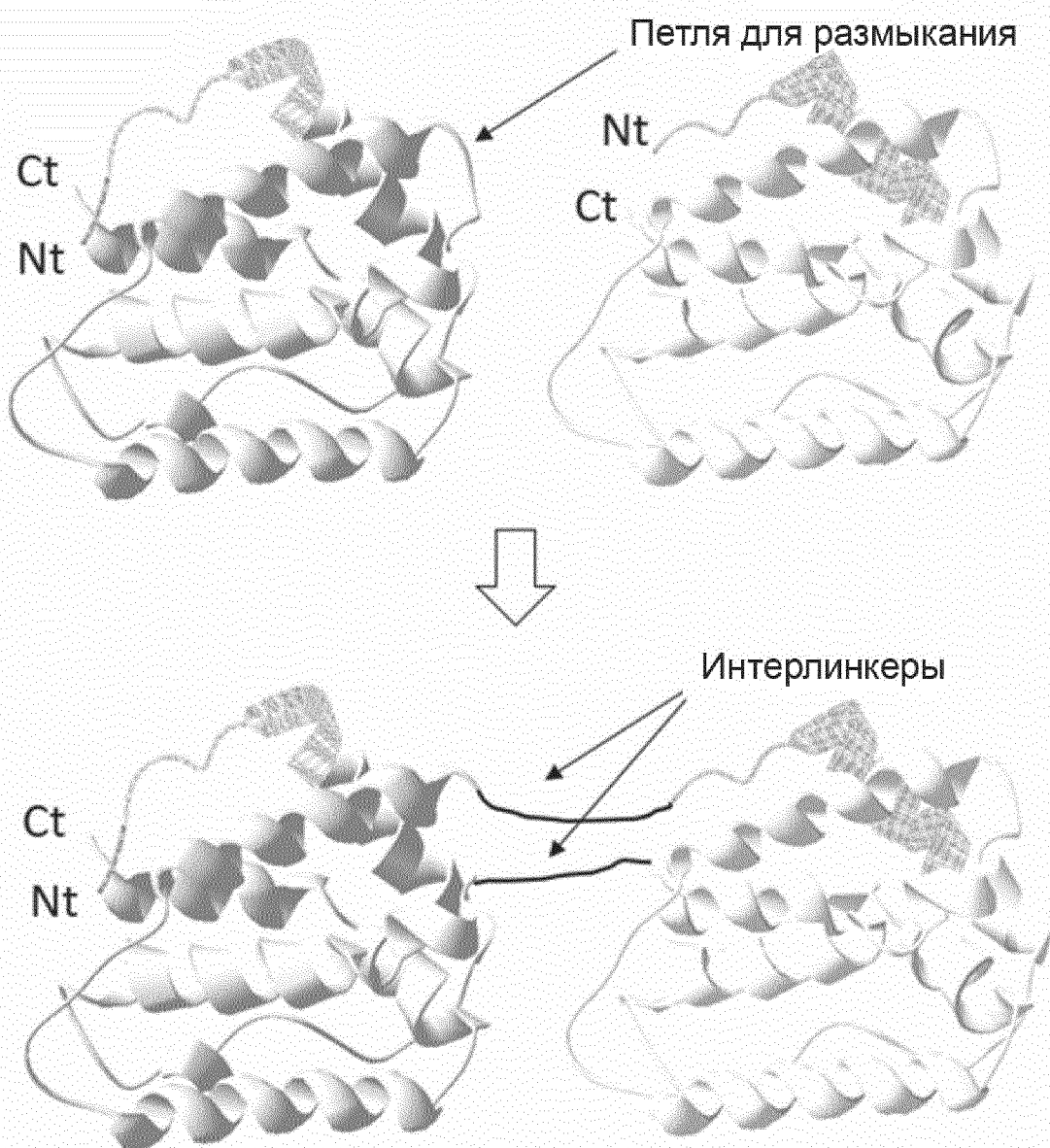
Фиг. 45



Фиг. 46



Фиг. 47



ФИГ. 48