

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090471 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.10

(22) Дата подачи заявки
2018.09.06

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/73 (2006.01)
C07K 14/735 (2006.01)

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

(31) 62/555,499

(32) 2017.09.07

(33) US

(86) PCT/US2018/049756

(87) WO 2019/051091 2019.03.14

(71) Заявитель:

КБЮ БИОФАРМА, ИНК. (US)

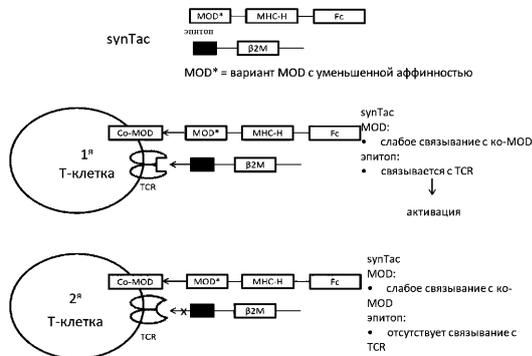
(72) Изобретатель:

Сайдел Рональд Д. III, Чапарро
Родольфо Дж. (US)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) В данном изобретении предложены модулирующие Т-клетки мультимерные полипептиды, содержащие иммуномодулирующий полипептид, который проявляет пониженную аффинность связывания к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид является пригодным для модуляции активности Т-клеток, а также для модуляции иммунного ответа у индивидуума.



202090471

A1

A1

202090471

МОДУЛИРУЮЩИЕ Т-КЛЕТКИ МУЛЬТИМЕРНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

Данная заявка испрашивает приоритет заявки на патент США № 62/555499, поданной 7 сентября 2017 г., которая включена в данное описание в качестве ссылки в полном объеме.

ВСТУПЛЕНИЕ

Адаптационный иммунный ответ включает взаимодействие рецептора Т-клеток (TCR), присутствующего на поверхности Т-клеток, с небольшим пептидным антигеном нековалентно представленным на поверхности антиген-представляющей клетки (АПК) с помощью главного комплекса гистосовместимости (ГКГС; также называемого в организме человека как комплекс антигена лейкоцитов человека (HLA)). Это взаимодействие представляет собой механизм нацеливания иммунной системы и является необходимым условием для молекулярного взаимодействия модуляции Т-клеток (активации или ингибирования) и эффекторной функции. После эпитоп-специфического нацеливания клеток, Т-клетки-мишени активируются посредством взаимодействия с костимуляторными белками, расположенными на АПК, с аналогичными костимуляторными белками Т-клеток. Оба сигнала – эпитоп/TCR-связывание и взаимодействие АПК костимуляторных белков с костимуляторными белками Т-клеток – требуется для управления Т-клеточной специфичностью и активации или ингибирования. TCR является специфическим для данного эпитопа; однако, костимуляторный белок не является эпитоп специфическим и поэтому, как правило, экспрессируется на всех Т-клетках или на больших подмножествах Т-клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении предложены модулирующие Т-клетки мультимерные полипептиды (ТММР), содержащие иммуномодулирующий полипептид, который проявляет пониженную аффинность связывания с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом. ТММР является полезным для модуляции активности Т-клеток, а также для модуляции иммунного ответа у индивидуума.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 изображена предпочтительная активация эпитоп-специфической Т-клетки к эпитопу неспецифической Т-клетки с помощью модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида согласно данному изобретению.

На фиг. 2A–2G представлены аминокислотные последовательности полипептидов Fc иммуноглобулина.

На фиг. 3A–3C представлены аминокислотные последовательности тяжелых цепей полипептидов лейкоцитарного антигена человека (HLA) класса I. Сигнальные последовательности подчеркнуты.

На фиг. 4 представлены множественное выравнивание аминокислотных последовательностей предшественников бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$) (т.е., включая лидерную последовательность) от *Homo sapiens* (NP_004039.1; SEQ ID NO:49), *Pan troglodytes* (NP_001009066.1; SEQ ID NO:49), *Macaca mulatta* (NP_001040602.1; SEQ ID NO:50), *Bos Taurus* (NP_776318.1; SEQ ID NO:51) и *Mus musculus* (NP_033865.2; SEQ ID NO:52). Аминокислоты 1-20 представляют собой сигнальный пептид.

На фиг. 5A–5K представлены аминокислотные последовательности примеров подходящих тяжелых цепей HLA.

На фиг. 6A–6D представлены схематические изображения различных модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов согласно данному изобретению.

На фиг. 7A–7D представлены схематические изображения различных дисульфид-связанных модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов согласно данному изобретению.

На фиг. 8 представлено выравнивание последовательностей одиннадцати пептидов зрелых тяжелых цепей ГКГС класса I без их лидерных последовательностей или трансмембранных доменов.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины – рибонуклеотидов, или дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, этот термин включает, без ограничения, единичные, двойные или множественные цепи ДНК или РНК, геномная ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые или пиримидиновые основания, или другие природные, химически, или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания.

Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме аминокислот любой длины, которая может включать кодирующие и не кодирующие аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или дериватизированные аминокислоты и полипептиды, имеющие модифицированный пептидные каркасы.

Полинуклеотид или полипептид имеет определенный процент «идентичности

последовательности» к другому полинуклеотиду или полипептиду, а это означает, что при выравнивании определенный процент оснований или аминокислот являются одинаковыми, и находится в том же относительном положении, при сравнении двух последовательностей. Идентичность последовательности может быть определена несколькими различными способами. Для определения идентичности последовательности, последовательности могут быть выровнены с использованием различных удобных методов и компьютерных программ (например, BLAST, T-COFFEE, MUSCLE, MAFFT и т.д.), доступны на сайтах интернет, включая ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/, ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/, mafft.cbrc.jp/alignment/software/. См., например, Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-10.

Термин «консервативная аминокислотная замена» относится к взаимозаменяемости в аминокислотных остатках белков, имеющим сходные боковые цепи. Так, например, группа аминокислот с алифатическими боковыми цепями состоит из глицина, аланина, валина, лейцина и изолейцина; группа аминокислот, имеющих алифатические-гидроксильные боковые цепи, состоит из серина и треонина; группа аминокислот, имеющих амид-содержащие боковые цепи, состоящие из аспарагина и глутамина; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, состоит из фенилаланина, тирозина и триптофана; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, состоит из лизина, аргинина и гистидина; группа аминокислот, имеющих кислотные боковые цепи состоит из глутамата и аспартата, а группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, состоит из цистеина и метионина. Типичные консервативные группы замещения аминокислот представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин-глицин и аспарагин-глутамин.

Термин «иммунологический синапс» или «иммунный синапс», используемые в данном документе, как правило, относятся к естественной границе взаимодействия между двумя взаимодействующими иммунными клетками адаптивного иммунного ответа, включая, например, границу взаимодействия между антигенпрезентирующей клеткой (АПК) или клеткой-мишенью и эффекторной клеткой, например, лимфоцитом, Т-клеточным эффектором, натуральной клеткой-киллером, и тому подобным. Иммунологический синапс между АПК и Т-клеткой, как правило, инициируется взаимодействием рецептора антигена Т-клеток и молекулой главного комплекса гистосовместимости, например, как описано в Bromley et al., *Annu Rev Immunol.* 2001;19:375-96; содержимое которой включено в данное описание в качестве ссылки в полном объеме.

«Т-клетка» включает все типы иммунных клеток, экспрессирующих CD3, включая

Т-клетки-хелперы (клетки CD4⁺), цитотоксические Т-клетки (клетки CD8⁺), Т-регуляторные клетки (Treg) и клетки NK-Т.

Термин «иммуномодулирующий полипептид» (также упоминается как «костимулирующий полипептид»), используемый в данном документе, включает полипептид на антиген презентирующей клетке (АПК) (например, дендритной клетке, В-клетке и тому подобном), которые специфически связывается с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом на Т-клетке, тем самым обеспечивая сигнал, который, в дополнение к основному сигналу, представленному, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с полипептидом главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), нагруженным пептидом, опосредует ответ Т-клеток, включая без ограничения, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Иммуномодулирующий полипептид может включать, без ограничения, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, лиганд Fas (FasL), индуцируемый костимуляторный лиганд (ICOS-L), межклеточную молекулу адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, бета-рецептор лимфотоксина, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, агонист или антитело, которое связывает рецептор-лиганд Toll и лиганд, который специфически связывается с B7-H3.

Как уже отмечалось выше «иммуномодулирующий полипептид» (также называемый в данном документе как «MOD») специфически связывается с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом на Т-клетке.

«Иммуномодулирующий домен» («MOD») модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида согласно данному изобретению связывает когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, который может присутствовать на Т-клетке-мишени.

«Гетерологичный», используемый в данном описании, означает нуклеотид или полипептид, который не найден в нативной нуклеиновой кислоте или белке, соответственно.

Термин «рекомбинантный», используемый в данном описании, означает, что конкретная нуклеиновая кислота (ДНК или РНК) являются продуктом различных комбинаций клонирования, рестрикции, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или стадий лигирования, приводящих к конструкции, имеющей структурные кодирующие или не кодирующие последовательности, отличные от эндогенных нуклеиновых кислот найденных в природных системах. Последовательности ДНК, кодирующие полипептиды, могут быть собраны из фрагментов кДНК или из серии синтетических олигонуклеотидов, чтобы обеспечить синтетическую нуклеиновую кислоту, которая способна экспрессироваться из рекомбинантной транскрипционной единицы, содержащейся в клетке или в бесклеточной транскрипционной и трансляционной системе.

Термины «рекомбинантный вектор экспрессии» или «конструкция ДНК» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения молекулы ДНК, содержащей вектор, и одну вставку. Рекомбинантные векторы экспрессии, как правило, создаются с целью экспрессии и/или распространения инсерции (инсерций), или для конструирования других рекомбинантных нуклеотидных последовательностей. Инсерция (инсерции) может или не может быть функционально связана с последовательностью промотора, и могут или не могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями ДНК.

Используемый в данном описании, термин «аффинность» относится к равновесной константе для обратимого связывания двух агентов (например, антитела и антигена) и выражается в виде константы диссоциации (K_D). Аффинность может быть по меньшей мере в 1 раз большей, по меньшей мере в 2 раза большей, по меньшей мере в 3 раза большей, по меньшей мере в 4 раза большей, по меньшей мере в 5 раз большей, по меньшей мере в 6 раз большей, по меньшей мере в 7 раз большей, по меньшей мере в 8 раз большей, по меньшей мере в 9 раз большей, по меньшей мере в 10 раз большей, по меньшей мере в 20 раз большей, по меньшей мере в 30 раз большей, по меньшей мере в 40 раз большей, по меньшей мере в 50 раз большей, по меньшей мере в 60 раз большей, по меньшей мере в 70 раз большей, по меньшей мере в 80 раз большей, по меньшей мере в 90 раз большей, по меньшей мере в 100 раз большей или по меньшей мере в 1000 раз большей или более, чем аффинность антитела для несвязанных аминокислотных последовательностей. Аффинности антитела к белку-мишени может составлять, например, от около 100 нМ (нМ) до около 0,1 нМ, от около 100 нМ до около 1 пикомоль (пМ), или от около 100 нМ до около 1 фемтомоль (фМ) или более. Используемый в данном описании, термин «авидность» относится к сопротивлению комплексов двух или более агентов диссоциировать после разбавления. Термины «иммунореактивный» и «преимущественно связывается» используются здесь взаимозаменяемо по отношению к антителам и/или их антигенсвязывающим фрагментам.

Термин «связывание», используемый в данном описании (например, со ссылкой на связывание модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида с полипептидом (например, рецептором Т-клеток) на Т-клетке), относится к нековалентному взаимодействию между двумя молекулами. Нековалентное связывание относится к прямой связи между двумя молекулами, из-за, например, электростатического, гидрофобного, ионного и/или взаимодействия водородных связей, в том числе взаимодействий, такие как водные мосты и солевые мосты. Взаимодействие нековалентного связывания, как правило, характеризуется константой диссоциации (K_D),

равной менее чем 10^{-6} М, менее чем 10^{-7} М, менее чем 10^{-8} М, менее чем 10^{-9} М, менее чем 10^{-10} М, менее чем 10^{-11} М, менее чем 10^{-12} М, менее чем 10^{-13} М, менее чем 10^{-14} М или менее чем 10^{-15} М. «Аффинность» относится к силе нековалентного связывания, повышенная аффинность связывания коррелирует с более низкой К_D. «Специфическое связывание» обычно относится к связыванию с аффинностью, равной по меньшей мере, около 10^{-7} М или более, например, 5×10^{-7} М, 10^{-8} М, 5×10^{-8} М, 10^{-9} М и более. «Неспецифическое связывание» обычно относится к связыванию (например, связывание лиганда с молекулой, отличной от его назначенного сайта связывания или рецептора) с аффинностью менее чем около 10^{-7} М (например, связывание с аффинностью, равной 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М). Тем не менее, в некоторых контекстах, например, связывание между TCR и пептидом/комплексом ГКГС «специфическое связывание» может находиться в диапазоне от 1 мкМ до 100 мкМ, или от 100 мкМ до 1 мМ. «Ковалентное связывание» или «ковалентная связь», используемая в данном описании, относится к образованию одной или более ковалентных химических связей между двумя различными молекулами.

Термины «лечение», «лечить» и т.п. используемые в данном документе, в общем означают получение желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полностью или частично предотвращения заболевания или симптома, и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения от заболевания и/или отрицательного влияния, относящегося к этому заболеванию. Термин «лечение», используемый в данном документе, охватывает любое лечение заболевания или симптома у млекопитающих, и включает: (а) предотвращение заболевания или симптома, возникающих у субъекта, который может быть предрасположен к приобретению или симптому заболевания, но еще не был диагностирован как имеющий его; (б) ингибирование заболевания или симптома, т.е. прекращение его развития; или (с) ослабление заболевания, то есть регрессия заболевания. Терапевтическое средство может быть введено до, во время или после начала заболевания или травмы. Лечение продолжающегося заболевания, при котором лечение стабилизирует или уменьшает нежелательные клинические симптомы пациента, представляет особый интерес. Такое лечение желательно осуществлять до полной потери функции в пораженных тканях. Указанное лечение будет желательно вводить в течение симптоматической стадии заболевания, а в некоторых случаях после симптоматической стадии заболевания.

Термины «индивидуум», «субъект», «хозяин» и «пациент» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любому млекопитающему, для которых желательна диагностика, лечение или терапия. Млекопитающие включают, например,

людей, отличных от человека приматов, грызунов (например, мышей, крыс), зайцеобразных (например, кроликов), копытных (например, коров, овец, свиней, лошадей, коз и тому подобных), и т.д.

Перед тем как данное изобретение описано далее, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку таковые могут, конечно, варьировать. Кроме того, следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

В случае, когда диапазон значений обеспечиваются, следует понимать, что каждое промежуточное значение, до десятой единицы нижнего предела, если контекст явно указано иначе, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим оговоренным или промежуточным значением в указанном диапазоне, охватывается данным изобретением. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, и также охватываются данным изобретением, с учетом любого специфически исключенного предела в указанном диапазоне. Там, где указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие любой или оба из этих включенных пределов, также включены в изобретение.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как обычно понимаемые специалистом в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут также быть использованы в практике или тестировании данного изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны ниже. Все публикации, упомянутые в данном описании, включены в данное описание в качестве ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми эти публикации цитируются.

Использование определений в единственном числе не исключает возможности наличия определений во множественном числе, если обратное прямо не указано в контексте. Так, например, ссылка на «модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид» включает множество таких полипептидов и ссылки на «иммуномодулирующий полипептид» включает в себя ссылку на один или более иммуномодулирующих полипептидов и их эквивалентов, известных специалист в данной области техники, и так далее. Следует также отметить, что формула изобретения может

быть составлена так, чтобы исключить любой необязательный элемент. Таким образом, это утверждение предназначено служить в качестве предшествующей основы для использования такой исключительной терминологии как «исключительно», «только» и тому подобное, в связи с перечислением элементов формулы изобретения или использования «отрицательного» ограничения.

Следует понимать, что определенные признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте. Наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, могут также быть представлены отдельно или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к данному изобретению, в частности, охватываются данным изобретением и описаны в данном документе, как если бы каждая комбинация была индивидуально и явно раскрыта. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементов, также конкретно охватываются данным изобретением и описаны в данном документе, как если бы каждая такая подкомбинация была индивидуально и явно раскрыты в данном документе.

Публикации, которые обсуждаются в данном документе, приводятся исключительно для их раскрытия до даты подачи данной заявки. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как признание того, что данное изобретение не имеет права на предшествование такой публикации в силу предшествующего изобретения. Кроме того, даты публикаций могут отличаться от действительных дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В данном изобретении предложены модулирующие Т-клетки мультимерные полипептиды, содержащие иммуномодулирующий полипептид, который проявляет пониженная аффинность связывания к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид является полезным для модуляции активности Т-клеток, а также для модуляции иммунного ответа у индивидуума.

МОДУЛИРУЮЩИЕ Т-КЛЕТКИ МУЛЬТИМЕРНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ

В данном изобретении предложен модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид (ТММР), содержащий: а) первый полипептид; и б) второй полипептид, причем мультимерный полипептид содержит эпитоп; первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС); второй полипептид ГКГС; один или более иммуномодулирующих полипептидов; и, необязательно, полипептид Fc иммуноглобулина

(Ig) или каркас не от Ig. В данном изобретении предложен ТММР, причем мультимерный полипептид представляет собой гетеродимер, содержащий: а) первый полипептид, содержащий первый полипептид ГКГС; и б) второй полипептид, содержащий второй полипептид ГКГС, при этом первый полипептид или второй полипептид содержит эпитоп; при этом первый полипептид и/или второй полипептид содержит один или более иммуномодулирующих полипептидов, которые могут быть одинаковыми или различными; и необязательно полипептид Fc Ig или каркас не от Ig. ТММР по данному изобретению также упоминается в данном документе как «мультимерный полипептид по данному изобретению» или «synTac».

В данном изобретении предложен ТММР, содержащий гетеродимерный полипептид, содержащий: а) первый полипептид, содержащий: i) пептидный эпитоп; и ii) первый полипептид ГКГС; б) второй полипептид, содержащий второй полипептид ГКГС; и с) по меньшей мере один иммуномодулирующий полипептид, причем первый и/или второй полипептид содержит, по меньшей мере, один (т.е. один или более) иммуномодулирующий полипептид. Необязательно, первый или второй полипептид содержит полипептид Fc Ig или каркас не от Ig. По меньшей мере один из одного или более иммуномодулирующих полипептидов представляет собой вариант иммуномодулирующего полипептида, который проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа для когнатного ко-иммуномодулирующего полипептида. Эпитоп, присутствующий в ТММР по данному изобретению связывается с рецептором Т-клеток (TCR) на Т-клетке с аффинностью, равной по меньшей мере, 100 мкМ (например, по меньшей мере 10 мкМ, по меньшей мере 1 мкМ, по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 10 нМ, или по меньшей мере 1 нМ). ТММР по данному изобретению связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая по меньшей мере на 25% выше, чем аффинность, с которым ТММР связывает вторую Т-клетку, причем первая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, и TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере, 100 мкМ, и при этом вторая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, но не экспрессирует на своей поверхности TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере 100 мкМ (например, по меньшей мере 10 мкМ, по меньшей мере 1 мкМ, по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 10 нМ или по меньшей мере 1 нМ).

В данном изобретении предложен ТММР, в котором мультимерный полипептид представляет собой:

А) гетеродимер, содержащий: а) первый полипептид, содержащий первый полипептид ГКГС; и б) второй полипептид, содержащий второй полипептид ГКГС, причем первый полипептид или второй полипептид содержит эпитоп; при этом первый полипептид и/или второй полипептид содержат один или более иммуномодулирующих полипептидов, которые могут быть одинаковыми или различными, и при этом по меньшей мере один из одного или более иммуномодулирующих полипептидов могут представлять собой иммуномодулирующий полипептид дикого типа или вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа, при этом вариант иммуномодулирующего полипептида содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью иммуномодулирующего полипептида дикого типа; и при этом первый полипептид или второй полипептид необязательно содержит полипептид Fc Ig или каркас не от Ig; или

В) гетеродимер, содержащий: а) первый полипептид, содержащий первый полипептид ГКГС; и б) второй полипептид, содержащий второй полипептид ГКГС, при этом первый полипептид или второй полипептид содержит эпитоп; при этом первый полипептид и/или второй полипептид содержат один или более иммуномодулирующих полипептидов, которые могут быть одинаковыми или различными,

при этом по меньшей мере один из одного или более иммуномодулирующих полипептидов представляют собой вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа, при этом вариант иммуномодулирующего полипептида содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью иммуномодулирующего полипептида дикого типа,

при этом, по меньшей мере один из одного или более иммуномодулирующих доменов представляет собой вариант иммуномодулирующего полипептида, который проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа для когнатного ко-иммуномодулирующего полипептида, и при этом эпитоп связывается с TCR на Т-клетке с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} М так, что: i) полипептид ТММР связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая на по меньшей мере 25% больше, чем аффинность с которой ТММР связывает вторую Т-клетку, при этом первая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид и TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} М, и при этом вторая Т-клетка экспрессирует на своей

поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, но не экспрессирует на своей поверхности TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} M; и/или ii) отношение аффинность связывания контрольного ТММР, причем контрольный содержит иммуномодулирующий полипептид дикого типа, к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду с аффинностью связывания ТММР, содержащего вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, которую измеряют с помощью биослойной интерферометрии, находится в диапазоне от 1,5:1 до 10^6 :1; и при этом вариант иммуномодулирующего полипептида содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью иммуномодулирующего полипептида дикого типа; и

при этом первый полипептид или второй полипептид необязательно содержит полипептид Fc Ig или каркас не от Ig; или

С) гетеродимер, содержащий: а) первый полипептид, содержащий, в направлении от N-конца к С-концу: i) эпитоп; ii) первый полипептид ГКГС и б) второй полипептид, содержащий, в направлении от N-конца к С-концу: i) второй полипептид ГКГС, и ii) необязательно полипептид Fc иммуноглобулина (Ig) или каркас не от Ig, причем мультимерный полипептид содержит один или более иммуномодулирующих доменов, которые могут быть одинаковыми или различными, при этом, по меньшей мере, один из одного или более иммуномодулирующим доменов расположен: А) на С-конце первого полипептида; В) на N-конце второго полипептида; С) на С-конце второго полипептида или D) на С-конце первого полипептида и на N-конце второго полипептида, и при этом по меньшей мере, один из одного или более иммуномодулирующих доменов может представлять собой иммуномодулирующий полипептид дикого типа или вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа, при этом вариант иммуномодулирующего полипептида содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замены по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа; и

необязательно при этом, по меньшей мере один из одного или более иммуномодулирующих доменов представляет собой вариант иммуномодулирующего полипептида, который проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа для когнатного ко-

иммуномодулирующего полипептида, и при этом эпитоп связывается с TCR на Т-клетке с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} М так, что: i) ТММР связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая на по меньшей мере 25% больше, чем аффинность с которой ТММР связывает вторую Т-клетку, при этом первая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид и TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} М, и при этом вторая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, но не экспрессирует на своей поверхности TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} М; и/или ii) отношение аффинность связывания контрольного ТММР, причем контрольный содержит иммуномодулирующий полипептид дикого типа, к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду с аффинностью связывания ТММР, содержащего вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, которую измеряют с помощью биослойной интерферометрии, находится в диапазоне от 1,5:1 до 10^6 :1; и при этом вариант иммуномодулирующего полипептида содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью иммуномодулирующего полипептида дикого типа.

В данном изобретении предложен ТММР, содержащий: а) первый полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу: i) эпитоп; ii) первый полипептид ГКГС; и б) второй полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу: i) второй полипептид ГКГС; и ii) необязательно полипептид Fc Ig, или каркас не от Ig. ТММР по данному изобретению содержит один или более иммуномодулирующих полипептидов, при этом по меньшей мере, один из одного или более иммуномодулирующих полипептидов расположен: А) на C-конце первого полипептида; В) на N-конце второго полипептида; С) на C-конце второго полипептида или D) на C-конце первого полипептида и на N-конце второго полипептида. По меньшей мере один из одного или более иммуномодулирующих полипептидов представляет собой вариант иммуномодулирующего полипептида, который проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа для когнатного ко-иммуномодулирующего полипептида. Эпитоп, присутствующий в ТММР по данному изобретению связывается с рецептором Т-клеток (TCR) на Т-клетке с аффинностью, равной по меньшей мере, 100 мкМ (например, по меньшей мере 10 мкМ, по меньшей мере 1 мкМ, по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 10 нМ, или по меньшей мере 1 нМ).

ТММР по данному изобретению связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая по меньшей мере на 25% выше, чем аффинность, с которым ТММР связывает вторую Т-клетку, причем первая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, и TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере, 100 мкМ, и при этом вторая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, но не экспрессирует на своей поверхности TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере 100 мкМ (например, по меньшей мере 10 мкМ, по меньшей мере 1 мкМ, по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 10 нМ или по меньшей мере 1 нМ).

В некоторых случаях, эпитоп, присутствующий в ТММР по данному изобретению связывается с TCR на Т-клетках с аффинностью, равной от около 10^{-4} М до около 5×10^{-4} М, от около 5×10^{-4} М до около 10^{-5} М, от около 10^{-5} М до 5×10^{-5} М, от около 5×10^{-5} М до 10^{-6} М, от около 10^{-6} М до около 5×10^{-6} М, от около 5×10^{-6} М до около 10^{-7} М, от около 10^{-7} М до около 5×10^{-7} М, от около 5×10^{-7} М до около 10^{-8} М или от около 10^{-8} М до около 10^{-9} М. Выражаясь по-другому, в некоторых случаях, эпитоп присутствующий в ТММР по данному изобретению, связывается с TCR на Т-клетках с аффинностью, равной от около 1 нМ до около 5 нМ, от около 5 нМ до около 10 нМ, от около 10 нМ до около 50 нМ, от около 50 нМ до около 100 нМ, от около 0,1 мкМ до около 0,5 мкМ, от около 0,5 мкМ до около 1 мкМ, от около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ, от около 75 мкМ до около 100 мкМ.

Иммуномодулирующий полипептид, присутствующий в ТММР по данному изобретению связывается с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом с аффинностью, которая на по меньшей мере 10% меньше, по меньшей мере 15% меньше, по меньшей мере 20% меньше, по меньшей мере 25% меньше, по меньшей мере 30% меньше, по меньшей мере 35% меньше, по меньшей мере 40% меньше, по меньшей мере 45% меньше, по меньшей мере 50% меньше, по меньшей мере 55% меньше, по меньшей мере 60% меньше, по меньшей мере 65% меньше, по меньшей мере 70% меньше, по меньшей мере 75% меньше, по меньшей мере 80% меньше, по меньшей мере 85% меньше, по меньшей мере 90% меньше, по меньшей мере 95% меньше или более чем на 95% меньше, чем аффинность соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду.

В некоторых случаях, вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующий в ТММР по данному изобретению имеет аффинность связывания к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, которая составляет от 1 нМ до 100

нМ или от 100 нМ до 100 мкМ. Например, в некоторых случаях, вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующий в ТММР по данному изобретению имеет аффинность связывания с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом, которая составляет от около 100 нМ до 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, до около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ. В некоторых случаях, вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующий в ТММР по данному изобретению имеет аффинность связывания с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом, которая составляет от около 1 нМ до около 5 нМ, от около 5 нМ до около 10 нМ, от около 10 нМ до около 50 нМ, от около 50 нМ до около 100 нМ.

Сочетание пониженной аффинности иммуномодулирующего полипептида с его когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом, и аффинность эпитопа с TCR, обеспечивает улучшенную селективность ТММР по данному изобретению. Например, ТММР по данному изобретению избирательно связывается с первой Т-клеткой, которая содержит на поверхности как : i) TCR, специфичный для эпитопа, присутствующего в ТММР, так и ii) ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывается с иммуномодулирующим полипептидом, присутствующим в ТММР, по сравнению со связыванием со второй Т-клеткой, которая содержит на поверхности: i) TCR, специфичный для эпитопа, отличного от эпитопа, присутствующего в ТММР, и ii) ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывается с иммуномодулирующим полипептидом, присутствующим в ТММР. Например, ТММР по данному изобретению связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, в по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 2,5 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 15 раз, по меньшей мере 20 раз, по меньшей мере 25 раз, по меньшей мере 50 раз, по меньшей мере 100 раз или больше чем 100 раз, больше аффинности, с которым он связывает вторую Т-клетку.

В некоторых случаях модулирующий Т-клетки полипептид по данному изобретению, при введении индивидууму, нуждающемуся в этом, индуцирует как эпитоп-специфический Т-клеточный ответ, так и эпитоп-неспецифический Т-клеточный ответ. Другими словами, в некоторых случаях модулирующий Т-клетки полипептид по данному изобретению, при введении индивидууму, нуждающемуся в этом, индуцирует эпитоп-специфический ответ Т-клеток, модулируя активность первой Т-клетки, которая содержит на поверхности как : i) TCR, специфичный для эпитопа, присутствующего в ТММР; так и ii) ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывается с иммуномодулирующим полипептидом, присутствующим в ТММР; и индуцирует эпитоп-неспецифический ответ Т-клеток путем модулирования активности второй Т-клетки, которая содержит на поверхности: i) TCR, специфичный для эпитопа, присутствующего в ТММР; и ii) ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывается с иммуномодулирующим полипептидом, присутствующим в ТММР. Отношение эпитоп-специфического Т-клеточного ответа к эпитоп-неспецифическому Т-клеточному ответу составляет по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 50:1 или по меньшей мере 100:1. Отношение эпитоп-специфического Т-клеточного ответа к эпитоп-неспецифическому Т-клеточному ответу составляет от около 2:1 до около 5:1, от около 5:1 до около 10:1, от около 10:1 до около 15:1, от около 15:1 до около 20:1, от около 20:1 до около 25:1, от около 25:1 до около 50:1, или от около 50:1 до около 100:1 или более чем 100:1. «Модулирование активности» Т-клетки может включать одно или более из: i) активирование цитотоксической Т-клетки (например, CD8⁺); ii) индукцию цитотоксической активности цитотоксической Т-клетки (например, CD8⁺); iii) индукцию продуцирования и высвобождения цитотоксина (например, перфорина; гранзима; гранулезина) цитотоксической Т-клеткой (например, CD8⁺) iv) ингибирование активности аутореактивной Т-клетки; и тому подобное.

Сочетание пониженной аффинности иммуномодулирующего полипептида с его когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом, и аффинность эпитопа с TCR, обеспечивает улучшенную селективность ТММР по данному изобретению. Таким образом, например, ТММР по данному изобретению связывается с повышенной авидностью с первой Т-клеткой, которая содержит на поверхности как : i) TCR, специфичный для эпитопа, присутствующего в ТММР, так и ii) ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывается с иммуномодулирующим полипептидом, присутствующим в ТММР, по сравнению с авидностью с которой он связывается со второй Т-клеткой, которая содержит на поверхности: i) TCR, специфичный для эпитопа,

отличного от эпитопа, присутствующего в ТММР, и ii) ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывается с иммуномодулирующим полипептидом, присутствующим в ТММР.

Аффинность связывания между иммуномодулирующим полипептидом и его когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом может быть определена с помощью биослойной интерферометрии (BLI) с использованием очищенного иммуномодулирующего полипептида и очищенного когнатного ко-иммуномодулирующего полипептида. Аффинность связывания между ТММР и его когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом может быть определена с помощью BLI с использованием очищенного ТММР и когнатного ко-иммуномодулирующего полипептида. Методы BLI хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Lad et al. (2015) *J. Biomol. Screen.* 20(4):498-507 и Shah and Duncan (2014) *J. Vis. Exp.* 18:e51383.

Анализ BLI может быть проведен с использованием прибора Octet RED 96 (Pal FortéBio) или аналогичного прибора следующим образом. ТММР (например, ТММР по данному изобретению; контрольный ТММР (причем контрольный ТММР содержит иммуномодулирующий полипептид дикого типа)) иммобилизуют на нерастворимой подложке («биосенсоре»). Иммобилизованный ТММР является «мишенью». Иммобилизацию можно осуществлять путем иммобилизации захватывающего антитела на нерастворимой подложке, где захватывающее антитело иммобилизует ТММР. Например, иммобилизация может быть осуществлена путем иммобилизации антителом к Fc (например, антителом против Fc IgG человека) на нерастворимой подложке, где иммобилизующие антитела против Fc связываются и иммобилизуют ТММР (причем ТММР содержит полипептид Fc Ig). Ко-иммуномодулирующий полипептид наносят в нескольких различных концентрациях на иммобилизованный ТММР и регистрируют реакцию прибора. Анализы проводят в жидкой среде, содержащей 25 мМ HEPES pH 6,8, 5% полиэтиленгликоля 6000, 50 мМ KCl, 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 0,02% неионогенного детергента Tween 20. Связывание ко-иммуномодулирующего полипептида с иммобилизованным ТММР проводят при 30 °С. В качестве положительного контроля аффинности связывания можно использовать моноклональное антитело против ГКГС класса I. Например, можно использовать моноклональное антитело против HLA класса I W6/32 (Американская коллекция типовых культур № HB-95; Parham et al. (1979) *J. Immunol.* 123:342), который имеет K_D , равную 7 нМ. Стандартная кривая может быть получена с использованием серийных разведений моноклонального антитела против ГКГС класса I. Ко-иммуномодулирующий полипептид, или mAb (моноклональное

антитело) против ГКГС класса I, является «аналитом». ВLI анализирует интерференционную картину белого света, отраженного от двух поверхностей: i) от иммобилизованного полипептида («мишень»); и ii) внутреннего эталонного слоя. Изменение количества молекул («аналита»; например, ко-иммуномодулирующего полипептида; антитела против HLA), связанных с наконечником биосенсора, вызывает изменение интерференционной картины; этот сдвиг в интерференционной картине может быть измерен в режиме реального времени. Два кинетических термина, которые описывают аффинность взаимодействия мишени и аналита, представляют собой константу ассоциации (k_a) и константу диссоциации (k_d). Отношение этих двух переменных (k_a/k_d) образует константу аффинности K_D .

Анализ ВLI проводят в многолуночном планшете. Для проведения анализа определяют схему планшета, определяют этапы анализа и назначают биосенсоры в программном обеспечении Octet Data Acquisition. Биосенсорную сборку гидратируют. Гидратированную биосенсорную сборку и планшет для анализа уравнивают в течение 10 минут на приборе Octet. Как только данные получены, полученные данные загружают в программу анализа данных Octet. Данные обрабатывают в окне Обработка путем указания метода вычитания эталона, выравнивания по оси Y, межшаговой коррекции и фильтрации Савицкого-Голея. Данные анализируют в окне анализа путем указания шагов для анализа (ассоциация и диссоциация), выбора модели подбора кривой (1: 1), метода подбора (глобального) и окна интереса (в секундах). Оценивают качество посадки. Значения K_D для каждого из данных (концентрация аналита) можно усреднить, если они находятся в 3-кратном диапазоне. Значения ошибки K_D должны находиться в пределах одного порядка значений константы аффинности; значения R^2 должны быть больше 0,95. См., например, Abdiche et al. (2008) *J. Anal. Biochem.* 377:209.

Если не указано иное, аффинность ТММР по данному изобретению к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, или аффинность контрольного ТММР (причем контрольный ТММР содержит иммуномодулирующий полипептид дикого типа) к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, определяют с использованием ВLI, как описано выше.

В некоторых случаях отношение: i) аффинности связывания контрольного ТММР (причем контроль содержит иммуномодулирующий полипептид дикого типа) к когнатному иммуномодулирующему полипептиду к ii) аффинности связывания ТММР по данному изобретению, содержащему вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа, к когнатному иммуномодулирующему полипептиду, измеренная с помощью ВLI (как описано выше), составляет по меньшей мере 1,5:1, по меньшей мере 2:1, по

меньшей мере 5:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 500:1, по меньшей мере 10^2 :1, по меньшей мере 5×10^2 :1, по меньшей мере 10^3 :1, по меньшей мере 5×10^3 :1, по меньшей мере 10^4 :1, по меньшей мере 10^5 :1 или по меньшей мере 10^6 :1. В некоторых случаях отношение: i) аффинности связывания контрольного ТММР (причем контроль содержит иммуномодулирующий полипептид дикого типа) к когнатному иммуномодулирующему полипептиду к ii) аффинности связывания ТММР по данному изобретению, содержащему вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа, к когнатному иммуномодулирующему полипептиду, измеренная с помощью ВЛІ (как описано выше), находится в диапазоне от 1,5:1 до 10^6 :1, например, от 1,5:1 до 10:1, от 10:1 до 50:1, от 50:1 до 10^2 :1, от 10^2 :1 до 10^3 :1, от 10^3 :1 до 10^4 :1, от 10^4 :1 до 10^5 :1 или от 10^5 :1 до 10^6 :1.

В качестве примера, когда контрольный ТММР содержит полипептид IL-2 дикого типа и где ТММР по данному изобретению содержит вариант полипептида IL-2 (содержащий от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью полипептида IL-2 дикого типа) в качестве иммуномодулирующего полипептида, отношение: i) аффинность связывания контрольного ТММР к рецептору IL-2 (то есть когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду) к ii) аффинности связывания ТММР по данному изобретению к рецептору IL-2, измеренная с помощью ВЛІ, составляет по меньшей мере 1,5:1, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 500:1, по меньшей мере 10^2 :1, по меньшей мере 5×10^2 :1, по меньшей мере 10^3 :1, по меньшей мере 5×10^3 :1, по меньшей мере 10^4 :1, по меньшей мере 10^5 :1 или по меньшей мере 10^6 :1. В некоторых случаях, когда контрольный ТММР содержит полипептид IL-2 дикого типа и где ТММР по данному изобретению содержит вариант полипептида IL-2 (содержащий от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью полипептида IL-2 дикого типа) в качестве иммуномодулирующего полипептида, отношение: i) аффинность связывания контрольного ТММР к рецептору IL-2 (то есть когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду) к ii) аффинности связывания ТММР по данному изобретению к рецептору IL-2, измеренная с помощью ВЛІ, находится в диапазоне от 1,5:1 до 10^6 :1, например, от 1,5:1 до 10:1, от 10:1 до 50:1, от 50:1 до 10^2 :1, от 10^2 :1 до 10^3 :1, от 10^3 :1 до 10^4 :1, от 10^4 :1 до 10^5 :1 или от 10^5 :1 до 10^6 :1.

В другом примере, когда контрольный ТММР содержит полипептид PD-L1 дикого типа и где ТММР по данному изобретению содержит вариант полипептида PD-L1

(содержащий от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью полипептида PD-L1 дикого типа) в качестве иммуномодулирующего полипептида, отношение: i) аффинность связывания контрольного ТММР к полипептиду PD-1 (то есть когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду) к ii) аффинности связывания ТММР по данному изобретению к полипептиду PD-1, измеренная с помощью BLI, составляет по меньшей мере 1,5:1, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 500:1, по меньшей мере 10^2 :1, по меньшей мере 5×10^2 :1, по меньшей мере 10^3 :1, по меньшей мере 5×10^3 :1, по меньшей мере 10^4 :1, по меньшей мере 10^5 :1 или по меньшей мере 10^6 :1.

В другом примере, когда контрольный ТММР содержит полипептид CD80 дикого типа и где ТММР по данному изобретению содержит вариант полипептида CD80 (содержащий от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью полипептида CD80 дикого типа) в качестве иммуномодулирующего полипептида, отношение: i) аффинность связывания контрольного ТММР к полипептиду CTLA4 (то есть когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду) к ii) аффинности связывания ТММР по данному изобретению к полипептиду CTLA4, измеренная с помощью BLI, составляет по меньшей мере 1,5:1, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 500:1, по меньшей мере 10^2 :1, по меньшей мере 5×10^2 :1, по меньшей мере 10^3 :1, по меньшей мере 5×10^3 :1, по меньшей мере 10^4 :1, по меньшей мере 10^5 :1 или по меньшей мере 10^6 :1.

В другом примере, когда контрольный ТММР содержит полипептид CD80 дикого типа и где ТММР по данному изобретению содержит вариант полипептида CD80 (содержащий от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью полипептида CD80 дикого типа) в качестве иммуномодулирующего полипептида, отношение: i) аффинность связывания контрольного ТММР к полипептиду CD28 (то есть когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду) к ii) аффинности связывания ТММР по данному изобретению к полипептиду CD28, измеренная с помощью BLI, составляет по меньшей мере 1,5:1, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 500:1, по меньшей мере 10^2 :1, по меньшей мере 5×10^2 :1, по меньшей мере 10^3 :1, по меньшей мере 5×10^3 :1, по меньшей мере 10^4 :1, по меньшей мере 10^5 :1 или по меньшей мере 10^6 :1.

В другом примере, когда контрольный ТММР содержит полипептид 4-1BBL дикого типа и где ТММР по данному изобретению содержит вариант полипептида 4-1BBL (содержащий от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью полипептида 4-1BBL дикого типа) в качестве иммуномодулирующего полипептида, отношение: i) аффинность связывания контрольного ТММР к полипептиду 4-1BV (то есть когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду) к ii) аффинности связывания ТММР по данному изобретению к полипептиду 4-1BV, измеренная с помощью VLI, составляет по меньшей мере 1,5:1, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 500:1, по меньшей мере 10^2 :1, по меньшей мере 5×10^2 :1, по меньшей мере 10^3 :1, по меньшей мере 5×10^3 :1, по меньшей мере 10^4 :1, по меньшей мере 10^5 :1 или по меньшей мере 10^6 :1.

В другом примере, когда контрольный ТММР содержит полипептид CD86 дикого типа и где ТММР по данному изобретению содержит вариант полипептида CD86 (содержащий от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью полипептида CD86 дикого типа) в качестве иммуномодулирующего полипептида, отношение: i) аффинность связывания контрольного ТММР к полипептиду CD28 (то есть когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду) к ii) аффинности связывания ТММР по данному изобретению к полипептиду CD28, измеренная с помощью VLI, составляет по меньшей мере 1,5:1, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 500:1, по меньшей мере 10^2 :1, по меньшей мере 5×10^2 :1, по меньшей мере 10^3 :1, по меньшей мере 5×10^3 :1, по меньшей мере 10^4 :1, по меньшей мере 10^5 :1 или по меньшей мере 10^6 :1.

Аффинность связывания ТММР по данному изобретению с Т-клеткой-мишенью может быть измерена следующим образом: А) приведение в контакт ТММР по данному изобретению с Т-клеткой-мишенью, экспрессирующей на своей поверхности: i) когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывает родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа; и ii) рецептор Т-клетки, который связывается с эпитопом, причем ТММР содержит метку эпитопа, так что ТММР связывается с Т-клеткой-мишенью; В) приведение в контакт ТММР, связанного с Т-клеткой-мишенью, с флуоресцентно меченным связывающим агентом (например, флуоресцентно меченным антителом), которое связывается с меткой эпитопа, создавая тем самым комплекс ТММР/Т-клетка-мишень/связывающий агент; С) измерение средней

интенсивности флуоресценции (MFI) комплекса ТММР/Т-клетка-мишень/связывающий агент с использованием проточной цитометрии. Меткой эпитопа может быть, например, метка FLAG, метка гемагглютинина, метка с-тус, полигистидиновая метка и т. д. MFI, измеренная в диапазоне концентраций элемента библиотеки ТММР, обеспечивает меру аффинности. MFI, измеренная в диапазоне концентраций элемента библиотеки ТММР, обеспечивает половину максимальной эффективной концентрации (EC_{50}) ТММР. В некоторых случаях EC_{50} ТММР по данному изобретению для Т-клетки-мишени находится в нМ (наномолярном) диапазоне; а EC_{50} ТММР для контрольной Т-клетки (причем контрольная Т-клетка экспрессирует на своей поверхности: i) когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывает родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа; и ii) Т-клеточный рецептор, который не связывается с эпитопом, присутствующим в ТММР) находится в мкМ (микромолярном) диапазоне. В некоторых случаях соотношение EC_{50} ТММР по данному изобретению для контрольной Т-клетки к EC_{50} ТММР для Т-клетки мишени составляет по меньшей мере 1,5:1, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 500:1, по меньшей мере 10^2 :1, по меньшей мере 5×10^2 :1, по меньшей мере 10^3 :1, по меньшей мере 5×10^3 :1, по меньшей мере 10^4 :1, по меньшей мере 10^5 :1 или по меньшей мере 10^6 :1. Отношение EC_{50} ТММР по данному изобретению для контрольной Т-клетки к EC_{50} ТММР для Т-клетки мишени является выражением селективности ТММР.

В некоторых случаях при измерении, описанном в предыдущем пункте, ТММР по данному изобретению проявляет избирательное связывание с Т-клеткой мишенью, по сравнению со связыванием элемента библиотеки ТММР с контрольной Т-клеткой мишенью, содержащей: i) когнатный иммуномодулирующий полипептид, который связывает родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа; и ii) Т-клеточный рецептор, который связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, присутствующего в элементе библиотеки ТММР.

Димеризованные модулирующие Т-клетки мультимерные полипептиды

Мультимерный модулирующий Т-клетки полипептид по данному изобретению может быть димеризован; то есть данное изобретение относится к мультимерному полипептиду, содержащему димер мультимерного модулирующий Т-клетки полипептида по данному изобретению. Таким образом, в данном изобретение предложен мультимерный модулирующий Т-клетки полипептид, содержащий: А) первый гетеродимер, содержащий: а) первый полипептид, содержащий: i) пептидный эпитоп; и ii)

первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС); и b) второй полипептид i) второй полипептид ГКГС, при этом первый гетеродимер содержит один или более иммуномодулирующих полипептидов; и B) второй гетеродимер, содержащий: a) первый полипептид, содержащий: i) пептидный эпитоп; и ii) первый полипептид ГКГС; и b) второй полипептид i) второй полипептид ГКГС, при этом второй гетеродимер содержит один или более иммуномодулирующих полипептидов, и при этом первый гетеродимер и второй гетеродимер ковалентно связаны друг с другом. В некоторых случаях два мультимерных модулирующих Т-клетки полипептида идентичны друг другу по аминокислотной последовательности. В некоторых случаях первый гетеродимер и второй гетеродимер ковалентно связаны друг с другом через С-концевую область второго полипептида первого гетеродимера и С-концевую область второго полипептида второго гетеродимера. В некоторых случаях первый гетеродимер и второй гетеродимер ковалентно связаны друг с другом через С-концевую аминокислоту второго полипептида первого гетеродимера и С-концевую область второго полипептида второго гетеродимера; например, в некоторых случаях С-концевая аминокислота второго полипептида первого гетеродимера и С-концевая область второго полипептида второго гетеродимера связаны друг с другом либо напрямую, либо через линкер. Линкер может представлять собой пептидный линкер. Пептидный линкер может иметь длину от 1 аминокислоты до 200 аминокислот (например, от 1 аминокислоты (ак) до 5 ак, от 5 ак до 10 ак, от 10 ак до 25 ак, от 25 ак до 50 ак, от 50 ак до 100 ак, от 100 ак до 150 ак или от 150 ак до 200 ак). В некоторых случаях пептидный эпитоп первого гетеродимера и пептидный эпитоп второго гетеродимера содержат одну и ту же аминокислотную последовательность. В некоторых случаях первый полипептид ГКГС первого и второго гетеродимера представляет собой β 2-микроглобулин ГКГС класса I, и при этом второй полипептид ГКГС первого и второго гетеродимера представляет собой тяжелую цепь ГКГС класса I. В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид первого гетеродимера и иммуномодулирующий полипептид второго гетеродимера содержат одну и ту же аминокислотную последовательность. В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид первого гетеродимера и иммуномодулирующий полипептид второго гетеродимера являются вариантами иммуномодулирующих полипептидов, которые содержат от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с соответствующим родительским иммуномодулирующим полипептидом дикого типа, и при этом от 1 до 10 аминокислотных замен приводят к снижению аффинного связывания варианта иммуномодулирующего полипептида с когнатным иммуномодулирующим полипептидом. В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид первого гетеродимера и

иммуномодулирующий полипептид второго гетеродимера оба выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1 (CD339), TGF β , CD70 и ICAM. Примеры подходящих полипептидов ГКГС, иммуномодулирующих полипептидов и пептидных эпитопов описаны ниже.

Полипептиды ГКГС

Как отмечено выше, мультимерный полипептид содержит полипептиды ГКГС. Для целей данного изобретения термин «полипептиды основного комплекса гистосовместимости (ГКГС)» включает полипептиды ГКГС различных видов, включая ГКГС человека (также называемые полипептидами лейкоцитарного антигена человека (HLA)), грызунов (например, мыши, крысы и т. д.) полипептиды ГКГС и полипептиды ГКГС других видов млекопитающих (например, зайцеобразных, приматов, отличных от человека, собачьих, кошачьих, копытных (например, лошадей, быков, овец, коз и т. д.) и т.п. Подразумевается, что термин «полипептид ГКГС» включает полипептиды ГКГС класса I (например, β -2-микроглобулин и тяжелую цепь ГКГС класса I) и полипептиды ГКГС класса II (например, α -полипептид ГКГС класса II и β -полипептид ГКГС класса II).

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

В некоторых случаях полипептид ГКГС мультимерного полипептида представляет собой полипептид ГКГС человека, причем полипептиды ГКГС человека также называют полипептидами «лейкоцитарного антигена человека» («HLA»). В некоторых случаях полипептид ГКГС мультимерного полипептида представляет собой полипептид HLA класса I, например, полипептид β 2-микроглобулина или полипептид тяжелой цепи HLA класса I. Полипептиды тяжелой цепи HLA класса I включают полипептиды тяжелой цепи HLA-A, полипептиды тяжелой цепи HLA-B, полипептиды тяжелой цепи HLA-C, полипептиды тяжелой цепи HLA-E, полипептиды тяжелой цепи HLA-F и полипептиды тяжелой цепи HLA-G. В некоторых случаях полипептид ГКГС мультимерного

полипептида представляет собой полипептид HLA класса II, например, α -цепь HLA класса II или β -цепь HLA класса II. Полипептиды ГКГС класса II включают полипептиды ГКГС класса II DP α и β , полипептиды DM α и β , полипептиды DOA α и β , полипептиды DOB α и β , полипептиды DQ α и β и полипептиды DR α и β .

На фиг. 8 представлено выравнивание последовательностей одиннадцати пептидов зрелых тяжелых цепей ГКГС класса I без их лидерных последовательностей или трансмембранных доменов. Выровненные последовательности представляют собой HLA-A, HLA-B и HLA-C человека, последовательность белка H2K мыши, три варианта HLA-A (вар.1, вар. 2C и вар.2CP), и 3 варианта HLA-A человека (HLA-A*1101; HLA-A*2402 и HLA-A*3303). В выравнивании указаны местоположения (84 и 139 зрелых белков), в которых могут быть вставлены остатки цистеина для образования дисульфидной связи для стабилизации комплекса ГКГС- β 2M в отсутствие связанного пептидного эпитопа. В выравнивании также показано положение 236 (зрелого полипептида), которое может быть замещено остатком цистеина, который может образовывать внутрицепочечную дисульфидную связь с β 2M (например, в 12 ак). Над каждым из этих мест находится стрелка, а остатки выделены жирным шрифтом. Седьмая последовательность HLA-A, показанная в выравнивании (вар. 2c), демонстрирует последовательность варианта 2, замещенную остатками C в положениях 84, 139 и 236. Рамки, окружающие остатки 84, 139 и 236, показывают группы из пяти аминокислот по обе стороны от этих шести наборов из пяти остатков, обозначенные акк1 (для «аминокислотного кластера 1»), акк2 (для «аминокислотного кластера 2»), акк3 (для «аминокислотного кластера 3»), акк4 (для «аминокислотного кластера 4»), акк5 (для «аминокислотного кластера 5») и акк6 (для «аминокислотного кластера 6»), которые могут быть заменены на 1-5 аминокислот, независимо выбранных из (i) любой встречающейся в природе аминокислоты или (ii) любой встречающейся в природе аминокислоты, за исключением пролина или глицина.

В некоторых случаях: i) ак1 (аминокислотный кластер 1) может представлять собой аминокислотную последовательность GTLRG (SEQ ID NO:219) или эту последовательность с одной или двумя аминокислотами, удаленными или замещенными другими встречающимися в природе аминокислотами (например, L замещен на I, V, A или F); ii) ак2 (аминокислотный кластер 2) может представлять собой аминокислотную последовательность YNQSE (SEQ ID NO:220) или эту последовательность с одной или двумя аминокислотами, удаленными или замещенными другими встречающимися в природе аминокислотами (например, N замещен на Q, Q замещен на N и/или E замещен на D); iii) ак3 (аминокислотный кластер 3) может представлять собой аминокислотную последовательность TAADM (SEQ ID NO:221) или эту последовательность с одной или

двумя аминокислотами, удаленными или замещенными другими встречающимися в природе аминокислотами (например, Т замещен на S, А замещен на G, D замещен на E, и/или М замещен на L, V или I); iv) ак4 (аминокислотный кластер 4) может представлять собой аминокислотную последовательность AQTTK (SEQ ID NO:222) или эту последовательность с одной или двумя аминокислотами, удаленными или замещенными другими встречающимися в природе аминокислотами (например, А замещен на G, Q замещен на N или Т замещен на S, и/или К замещен на R или Q); v) ак5 (аминокислотный кластер 5) может представлять собой аминокислотную последовательность VETRP (SEQ ID NO:223) или эту последовательность с одной или двумя аминокислотами, удаленными или замещенными другими встречающимися в природе аминокислотами (например, V замещен на I или L, E замещен на D, Т замещен на S, и/или R замещен на K); и/или vi) ак6 (аминокислотный кластер 6) может представлять собой аминокислотную последовательность GDGTF (SEQ ID NO:224) или эту последовательность с одной или двумя аминокислотами, удаленными или замещенными другими встречающимися в природе аминокислотами (например, D замещен на E, Т замещен на S или F замещен на L, W или Y).

В таблице 1 приведены примеры тяжелых цепей HLA, которые могут быть включены в ТММР по данному изобретению.

Таблица 1

Номер п/п	Базовая последовательность (с Фиг. 8)	SEQ ID NO	последовательности идентичности Диапазон	Конкретные замены в аминокислотной позиции 84, 139 и/или 236	Замены в позиции 115 и/или 167
1	HLA-A	242	100%	Отсутствует	Отсутствует
2	HLA-A	242	75%-99,8%; 80%-99,8%; 85%-99,8%; 90%-99,8%; 95%-99,8%; 98%-99,8% или 99%-99,8%; (или 1-25, 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, или 20-25 аминокислотных инсерций, делеций и/или замен)	Отсутствует; Y84C; A139C; A236C; (Y84A и A236C); (Y84C и A139C); (Y84C, A139C и A236C)	Отсутствует; W115C; W167A; или W167C
3	HLA-B	243	100%	Отсутствует	Отсутствует
4	HLA-B	243	75%-99,8%; 80%-99,8%; 85%-99,8%; 90%-99,8%; 95%-99,8%; 98%-99,8% или 99%-99,8%;	Отсутствует; Y84C; A139C; A236C; (Y84A и A236C); (Y84C и	Отсутствует; W115C; W167A; или W167C

Номер п/п	Базовая последовательность (с Фиг. 8)	SEQ ID NO	последовательности идентичности Диапазон	Конкретные замены в аминокислотной позиции 84, 139 и/или 236	Замены в позиции 115 и/или 167
			(или 1-25, 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, или 20-25 аминокислотных инсерций, делеций и/или замен)	A139C); (Y84C, A139C и A236C)	
5	HLA-C	244	100%	Отсутствует	Отсутствует
6	HLA-C	244	75%-99,8%; 80%-99,8%; 85%-99,8%; 90%-99,8%; 95%-99,8%; 98%-99,8% или 99%-99,8%; (или 1-25, 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, или 20-25 аминокислотных инсерций, делеций и/или замен)	Отсутствует; Y84C; A139C; A236C; (Y84A и A236C); (Y84C и A139C); (Y84C, A139C и A236C)	Отсутствует; W115C; W167A; или W167C
7	HLA-A (вар. 1)	53	100%	Отсутствует	Отсутствует
8	HLA-A (вар. 1)	53	75%-99,8%; 80%-99,8%; 85%-99,8%; 90%-99,8%; 95%-99,8%; 98%-99,8% или 99%-99,8%; (или 1-25, 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, или 20-25 аминокислотных инсерций, делеций и/или замен)	Отсутствует; Y84C; A139C; A236C; (Y84A и A236C); (Y84C и A139C); (Y84C, A139C и A236C)	Отсутствует; W115C; W167A; или W167C
9	H2K мыши	54	100%	Отсутствует	Отсутствует
10	H2K мыши	54	75%-99,8%; 80%-99,8%; 85%-99,8%; 90%-99,8%; 95%-99,8%; 98%-99,8% или 99%-99,8%; (или 1-25, 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, или 20-25 аминокислотных инсерций, делеций и/или замен)	Отсутствует; Y84C; A139C; A236C; (Y84A и A236C); (Y84C и A139C); (Y84C, A139C и A236C)	Отсутствует; W115C; W167A; или W167C
11	HLA-A*1101	248	100%	Отсутствует	Отсутствует
12	HLA-A*1101	248	75%-99,8%; 80%-99,8%; 85%-99,8%; 90%-99,8%; 95%-	Отсутствует; Y84C; A139C; A236C; (Y84A и	Отсутствует; W115C; W167A; или

Номер п/п	Базовая последовательность (с Фиг. 8)	SEQ ID NO	последовательности идентичности Диапазон	Конкретные замены в аминокислотной позиции 84, 139 и/или 236	Замены в позиции 115 и/или 167
			99,8%; 98%-99,8% или 99%-99,8%; (или 1-25, 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, или 20-25 аминокислотных инсерций, делеций и/или замен)	A236C); (Y84C и A139C); (Y84C, A139C и A236C)	W167C
13	HLA-A*2402	249	100%	Отсутствует	Отсутствует
14	HLA-A*2402	249	75%-99,8%; 80%-99,8%; 85%-99,8%; 90%-99,8%; 95%-99,8%; 98%-99,8% или 99%-99,8%; (или 1-25, 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, или 20-25 аминокислотных инсерций, делеций и/или замен)	Отсутствует; Y84C; A139C; A236C; (Y84A и A236C); (Y84C и A139C); (Y84C, A139C и A236C)	Отсутствует; W115C; W167A; или W167C
15	HLA-A*3303	250	100%	Отсутствует	Отсутствует
16	HLA-A*3303	250	75%-99,8%; 80%-99,8%; 85%-99,8%; 90%-99,8%; 95%-99,8%; 98%-99,8% или 99%-99,8%; (или 1-25, 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, или 20-25 аминокислотных инсерций, делеций и/или замен)	Отсутствует; Y84C; A139C; A236C; (Y84A и A236C); (Y84C и A139C); (Y84C, A139C и A236C)	Отсутствует; W115C; W167A; или W167C

HLA-A

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

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
WDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQ

YAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRY
 LENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTE
 LVETRPAGDGTFFQKWA AVVVPSGQEQRYSYCHVQHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID
 NO:53).

HLA-A (Y84A; A236C)

В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит замены Y84A и A236C. Например, в некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью тяжелой цепи HLA-A человека (Y84A; A236C):
 GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
 WDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGA^YYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS^DWRFLRGYHQ
 YAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRY
 LENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTE
 LVETRPC^GDGTFFQKWA AVVVPSGQEQRYSYCHVQHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID
 NO:225), где аминокислота 84 представляет собой Ala, а аминокислота 236 представляет собой Cys. В некоторых случаях Cys-236 образует межцепочечную дисульфидную связь с Cys-12 варианта β 2M полипептида, который содержит замену R12C.

HLA-A (Y84C; A139C)

В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит замены Y84C и A139C. Например, в некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью тяжелой цепи HLA-A человека (Y84C; A139C):
 GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
 WDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGC^YYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS^DWRFLRGYHQ
 YAYDGKDYIALKEDLRSWTAADM^CAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRY
 LENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTE
 LVETRPAGDGTFFQKWA AVVVPSGQEQRYSYCHVQHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID
 NO:226), где аминокислота 84 представляет собой Cys, а аминокислота 139 представляет собой Cys. В некоторых случаях Cys-84 образует внутрицепочечную дисульфидную связь

с Cys-139.

HLA-A A11 (HLA-A*1101)

В одном неограничивающем примере полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного полипептида может содержать аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью тяжелой цепи HLA-A A11 человека: GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRNVKAQSQTDRVDLGLTLRGYYNQSEDGSHTIQIMYGCDVGPDGRFLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAANAHAEEQRAYLEGTCVEWLRRYL ENGKETLQRTDPPKTHMTTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGTGFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:227). Такая тяжелая цепь ГКГС класса I может быть видна в азиатских популяциях, включая популяции лиц азиатского происхождения.

HLA-A A11 (Y84A; A236C)

В качестве одного неограничивающего примера, в некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I представляет собой аллель HLA-A A11, который содержит замены Y84A и A236C. Например, в некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью тяжелой цепи HLA-A A11 человека (Y84A; A236C): GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRNVKAQSQTDRVDLGLTLRG \underline{A} YNNQSEDGSHTIQIMYGCDVGPDGRFLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAANAHAEEQRAYLEGTCVEWLRRYL ENGKETLQRTDPPKTHMTTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRP \underline{C} GDGTGFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:228), где аминокислота 84 представляет собой Ala, а аминокислота 236 представляет собой Cys. В некоторых случаях Cys-236 образует межцепочечную дисульфидную связь с Cys-12 варианта β 2M полипептида, который содержит замену R12C.

HLA-A24 (HLA-A*2402)

В одном неограничивающем примере полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного полипептида может содержать аминокислотную последовательность,

имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью тяжелой цепи HLA-A24 человека: GSHSMRYFSTSVSRPGRGEPRIA VGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY WDEETGKVKANHSQTDRENLRALRYYNQSEAGSHTLQMMFGCDVGS DGRFLRGYHQY AYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHVAEQQRAYLEGTCVDGLRRYL ENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGTFFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE PSSQPTVPIVGIIA GLVLLGAVITGAVVA AVMWRRNSSDRKGGSYSQAASSDSAQGS DVS LTACKV (SEQ ID NO:240). Такая тяжелая цепь ГКГС класса I может быть видна в азиатских популяциях, включая популяции лиц азиатского происхождения. В некоторых случаях аминокислота 84 представляет собой Ala. В некоторых случаях аминокислота 84 представляет собой Cys. В некоторых случаях аминокислота 236 представляет собой Cys. В некоторых случаях аминокислота 84 представляет собой Ala, а аминокислота 236 представляет собой Cys. В некоторых случаях аминокислота 84 представляет собой Cys, а аминокислота 236 представляет собой Cys.

HLA-A33 (HLA-A*3303)

В одном неограничивающем примере полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного полипептида может содержать аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью тяжелой цепи HLA-A33 человека: GSHSMRYFTTSVSRPGRGEPRIA VGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY WDRNTRNVKAHSQIDRVDLGLTRGYYNQSEAGSHTIQMMYGC DVGSDGRFLRGYQQD AYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITQRKWEAARVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYL ENGKETLQRTDPPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALS FYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGTFFQK WASVVVPSGQE QRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE PSSQPTIPIVGIIAG LVLFGAVFAGAVVA AVRWRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGS DMSLTACKV (SEQ ID NO:241). Такая тяжелая цепь ГКГС класса I может быть видна в азиатских популяциях, включая популяции лиц азиатского происхождения. В некоторых случаях аминокислота 84 представляет собой Ala. В некоторых случаях аминокислота 84 представляет собой Cys. В некоторых случаях аминокислота 236 представляет собой Cys. В некоторых случаях аминокислота 84 представляет собой Ala, а аминокислота 236 представляет собой

Cys. В некоторых случаях аминокислота 84 представляет собой Cys, а аминокислота 236 представляет собой Cys.

HLA-B

В качестве другого примера полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного полипептида может содержать аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью тяжелой цепи HLA-B человека: GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFISVGYVDDTQFVRFSDAASPREEPRAPWIEQEGPEY WDRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQSMYGC DVGPDGRLLRGHDQY AYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRRAYLEGECEVWLRRYLE NGKDKLERADPPKTHVTNHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELV ETRPAGDRTFQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWER (SEQ ID NO:229).

HLA-B (Y84A; A236C)

В качестве одного неограничивающего примера, в некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I представляет собой полипептид HLA-B, который содержит замены Y84A и A236C. Например, в некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью тяжелой цепи HLA-B человека (Y84A; A236C): GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFISVGYVDDTQFVRFSDAASPREEPRAPWIEQEGPEY WDRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGAYNNQSEAGSHTLQSMYGC DVGPDGRLLRGHDQY AYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRRAYLEGECEVWLRRYLE NGKDKLERADPPKTHVTNHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELV ETRPCGDRTFQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWER (SEQ ID NO:230), где аминокислота 84 представляет собой Ala, а аминокислота 236 представляет собой Cys. В некоторых случаях Cys-236 образует межцепочечную дисульфидную связь с Cys-12 варианта β2M полипептида, который содержит замену R12C.

HLA-B (Y84C; A139C)

В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит замены Y84C и A139C. Например, в некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по

меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью тяжелой цепи HLA-B человека (Y84C; A139C):
 GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFISVGYVDDTQFVRFSDAASPREEPRAPWIEQEGPEY
 WDRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGCYNQSEAGSHTLQSMYGCDVGPDRLLRGHDQY
 AYDGKDYIALNEDLRSWTAADTCAQITQRKWEAAREAEQRRAYLEGECEVWLRRYLE
 NGKDKLERADPPKTHVTNHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELV
 ETRPAGDRTFQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF (SEQ ID NO:231),
 где аминокислота 84 представляет собой Cys, а аминокислота 139 представляет собой Cys.
 В некоторых случаях Cys-84 образует внутрицепочечную дисульфидную связь с Cys-139.

HLA-C

В качестве другого примера полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного полипептида может содержать аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью тяжелой цепи HLA-C человека:
 CSHSMRYFDTA VSRPGRGEPFISVGYVDDTQFVRFSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEY
 WDRETQNYKRQAQADRVSLRNLRGYYNQSEDSHTLQRMYGCDLGPDRLLRGYDQ
 SAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKLEAARAAEQRLRAYLEGTCVEWLRRYLE
 NGKETLQRAEPPKTHVTNHPLSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELV
 ETRPAGDGTTFQKWA AVVPSGQEQRYTCHMQHEGLQEPLTLSEF (SEQ ID NO:232).

HLA-C (Y84A; A236C)

В качестве одного неограничивающего примера, в некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I представляет собой полипептид HLA-C, который содержит замены Y84A и A236C. Например, в некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью тяжелой цепи HLA-C человека (Y84A; A236C):
 CSHSMRYFDTA VSRPGRGEPFISVGYVDDTQFVRFSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEY
 WDRETQNYKRQAQADRVSLRNLRGAYNQSEDSHTLQRMYGCDLGPDRLLRGYDQ
 SAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKLEAARAAEQRLRAYLEGTCVEWLRRYLE

NGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELV
 ETRPCGDGTFQKWA⁸⁴AVVPSGQEQR²³⁶YTC⁸⁴HMQHEGLQEPLT²³⁶LSWEP (SEQ ID NO:233),
 где аминокислота 84 представляет собой Ala, а аминокислота 236 представляет собой Cys.
 В некоторых случаях Cys-236 образует межцепочечную дисульфидную связь с Cys-12
 варианта β2M полипептида, который содержит замену R12C.

HLA-C (Y84C; A139C)

В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит замены
 Y84C и A139C. Например, в некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I
 содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по
 меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере,
 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности
 аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной
 последовательностью тяжелой цепи HLA-C человека (Y84C; A139C):
 CSHSMRYFDTA⁸⁴VS⁸⁴RPGRGEP⁸⁴RFISVGYVDDTQFVRFDS⁸⁴DAASPRGEP⁸⁴RAPWVEQEGPEY
 WDRETQNYKRQAQADR⁸⁴VSLRNL⁸⁴RGCYNQSE⁸⁴DGSH⁸⁴TLQRM⁸⁴YGCDL⁸⁴GP⁸⁴DGRLL⁸⁴RGYDQ
 SAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTCAQITQRKLEAARAAEQLRAYLEGTCVEWLR⁸⁴RYLE
 NGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELV
 ETRPAGDGTFQKWA⁸⁴AVVPSGQEQR¹³⁹YTC⁸⁴HMQHEGLQEPLT¹³⁹LSWEP (SEQ ID NO:234),
 где аминокислота 84 представляет собой Cys, а аминокислота 139 представляет собой Cys.
 В некоторых случаях Cys-84 образует внутрицепочечную дисульфидную связь с Cys-139.

Полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного полипептида может
 содержать аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по
 меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере,
 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности
 аминокислотной последовательности с одной аминокислотной последовательностью,
 представленной на фиг. 5A–5K.

В качестве примера, полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного
 полипептида может содержать аминокислотную последовательность, имеющую, по
 меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере,
 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100%
 идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотами 25-365
 аминокислотной последовательностью полипептида тяжелой цепи HLA-A человека,
 изображенного на фиг. 3A.

В качестве другого примера, полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I
 мультимерного полипептида может содержать аминокислотную последовательность,

имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотами 25-362 аминокислотной последовательностью полипептида тяжелой цепи HLA-B человека, изображенного на фиг. 3B.

В качестве другого примера, полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I мультимерного полипептида может содержать аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотами 25-362 аминокислотной последовательностью полипептида тяжелой цепи HLA-C человека, изображенного на фиг. 3C.

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

GPHSLRYFVTAVSRPGLGEPRIA VGYVDDTQFVRFDSADNPRFEPRAPWMEQ
EGPEYWEEQTQRAKSDEQWFRVSLRTAQRYYNQSKGGSHTFQRMFGCDVGS DWRLLR
GYQQFA YDGRDYIALNEDLKTWTAADTAALITRRKWEQAGDAEYYRAYLEGECEVWL
RRYLELGNETLLRTDSPKANHVTYHPRSQVDVTLRCWALGFYPADITLTWQLNGEDLTQ
DMELVETRPAGDGT FQKWA AVVVPLGKEQNYTCHVHHKGLPEPLTLRW (SEQ ID
NO:54).

Полипептид β 2-микроглобулина (β 2M) мультимерного полипептида может представлять собой полипептид β 2M человека, полипептида β 2M примата, отличного от человека, полипептид β 2M мыши и тому подобное. В некоторых случаях полипептид β 2M содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью β 2M, представленной на фиг. 4. В некоторых случаях полипептид β 2M содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной

последовательности с аминокислотами 21–119 аминокислотной последовательностью β 2M, представленной на фиг. 4.

В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит следующую аминокислотную последовательность:
 GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
 WDGETRKVKAHSQTHRVDL(ак1){C}(ак2)AGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYA
 YDGKDYIALKEDLR SW(ак3){C}(ак4)HKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGK
 ETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETR
 PAGDGT FQKWA AVVVPSGQEQR YTCHVQHEGLPKPLTLR WEP (SEQ ID NO:238), где
 остатки цистеина, обозначенные как {C} образуют дисульфидную связь между спиралями α 1 и α 2-1. В приведенной выше последовательности «ак1» означает «аминокислотный кластер 1»; «ак2» означает «аминокислотный кластер 2»; «ак3» означает «аминокислотный кластер 3», а «ак4» означает «аминокислотный кластер 4»; см., например, Фиг. 8. «Аминокислотный кластер» представляет собой кластер из 5 смежных аминокислот, как показано на фиг. 8.

В некоторых случаях пригодный полипептид β 2M содержит следующую аминокислотную последовательность:

IQRTPKIQVY SCHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE
 HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTL SQP KIVKWDRDM (SEQ ID
 NO:56); а полипептид тяжелой цепи HLA класса I содержит следующую аминокислотную последовательность:

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQE
 GPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDL(aa1){C}(aa2)AGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGY
 HQYAYDGKDYIALKEDLR SW(aa3){C}(aa4)HKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRY
 LENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTE
 L(aa5)(C)(aa6)QKWA AVVVPSGQEQR YTCHVQHEGLPKPLTLR WEP (SEQ ID NO:239),
 где остатки цистеина, обозначенные как {C} образуют дисульфидную связь между спиралями α 1 и α 2-1, а остатки (C) образует дисульфидную связь с цистеином полипептида β 2M в положении 12. В приведенной выше последовательности «ак1» означает «аминокислотный кластер 1»; «ак2» означает «аминокислотный кластер 2»; «ак3» означает «аминокислотный кластер 3», «ак4» означает «аминокислотный кластер 4», «ак5» означает «аминокислотный кластер 5»; а «акб» означает «аминокислотный кластер б»; см., например, Фиг. 8. Каждое появление ак1, ак2, ак3, ак4, ак5 и акб независимо выбирают из 1-5 аминокислотных остатков, причем аминокислотные остатки i) выбирают независимо из любой встречающейся в природе (например, кодированной)

аминокислоты или ii) любой встречающейся в природе аминокислоты, кроме пролина или глицина.

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

В некоторых случаях первый полипептид ГКГС в первом полипептиде мультимерного полипептида и/или второй полипептид ГКГС во втором полипептиде мультимерного полипептида содержат аминокислотную замену с заменой аминокислоты цистеином, причем замещенный цистеин в первом полипептиде ГКГС образует дисульфидную связь с цистеином во втором полипептиде ГКГС, при этом цистеин в первом полипептиде ГКГС образует дисульфидную связь с замещенным цистеином во втором полипептиде ГКГС, или при этом замещенный цистеин, находящийся в первом полипептиде ГКГС, образует дисульфидную связь с замещенным цистеином во втором полипептиде ГКГС.

Например, в некоторых случаях одна из следующих пар остатков в β 2-микроглобулине HLA и тяжелой цепи HLA класса I замещается цистеинами (где номера остатков соответствуют номерам в зрелом полипептиде): 1) остаток 12 β 2M, остаток 236 тяжелой цепи HLA класса I; 2) остаток 12 β 2M, остаток 237 тяжелой цепи HLA класса I; 3) остаток 8 β 2M, остаток 234 тяжелой цепи HLA класса I; 4) остаток 10 β 2M, остаток 235 тяжелой цепи HLA класса I; 5) остаток 24 β 2M, остаток 236 тяжелой цепи HLA класса I; 6) остаток 28 β 2M, остаток 232 тяжелой цепи HLA класса I; 7) остаток 98 β 2M, остаток 192 тяжелой цепи HLA класса I; 8) остаток 99 β 2M, остаток 234 тяжелой цепи HLA класса I; 9) остаток 3 β 2M, остаток 120 тяжелой цепи HLA класса I; 10) остаток 31 β 2M, остаток 96 тяжелой цепи HLA класса I; 11) остаток 53 β 2M, остаток 35 тяжелой цепи HLA класса I; 12) остаток 60 β 2M, остаток 96 тяжелой цепи HLA класса I; 13) остаток 60 β 2M, остаток 122 тяжелой цепи HLA класса I; 14) остаток 63 β 2M, остаток 27 тяжелой цепи HLA класса I; 15) остаток Arg3 β 2M, остаток Gly120 тяжелой цепи HLA класса I; 16) остаток His31 β 2M, остаток Gln96 тяжелой цепи HLA класса I; 17) остаток Asp53 β 2M, остаток Arg35 тяжелой цепи HLA класса I; 18) остаток Trp60 β 2M, остаток Gln96 тяжелой цепи HLA класса I; 19) остаток Trp60 β 2M, остаток Asp122 тяжелой цепи HLA класса I; 20) остаток

Тyr63 β 2М, остаток Тyr27 тяжелой цепи HLA класса I; 21) остаток Lys6 β 2М, остаток Glu232 тяжелой цепи HLA класса I; 22) остаток Gln8 β 2М, остаток Arg234 тяжелой цепи HLA класса I; 23) остаток Тyr10 β 2М, остаток Pro235 тяжелой цепи HLA класса I; 24) остаток Ser11 β 2М, остаток Gln242 тяжелой цепи HLA класса I; 25) остаток Asn24 β 2М, остаток Ala236 тяжелой цепи HLA класса I; 26) остаток Ser28 β 2М, остаток Glu232 тяжелой цепи HLA класса I; 27) остаток Asp98 β 2М, остаток His192 тяжелой цепи HLA класса I и 28) остаток Met99 β 2М, остаток Arg234 тяжелой цепи HLA класса I. Нумерация аминокислот тяжелой цепи ГКГС/HLA класса I относится к зрелой тяжелой цепи ГКГС/HLA класса I без сигнального пептида. Например, в аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 3А, которая содержит сигнальный пептид, Gly120 представляет собой Gly144; Gln96 представляет собой Gln120; и т.д. В некоторых случаях полипептид β 2М содержит замену R12C, а тяжелая цепь HLA класса I содержит замену A236C; в таких случаях дисульфидная связь образуется между Cys-12 полипептида β 2М и Cys-236 тяжелой цепи HLA класса I. Например, в некоторых случаях остаток 236 аминокислотной последовательности зрелого HLA-A (то есть остаток 260 аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 3А) заменен на Cys. В некоторых случаях остаток 236 аминокислотной последовательности зрелого HLA-B (то есть остаток 260 аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 3В) заменен на Cys. В некоторых случаях остаток 236 аминокислотной последовательности зрелого HLA-C (то есть остаток 260 аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 3С) заменен на Cys. В некоторых случаях остаток 32 (соответствующий Arg-12 зрелого β 2М) аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 4 заменен на Cys.

В некоторых случаях полипептид β 2М содержит аминокислотную последовательность: IQRTPKIQVY SRHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTL SQP KIVKWDRDM (SEQ ID NO:55). В некоторых случаях полипептид β 2М содержит аминокислотную последовательность: IQRTPKIQVY SCHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTL SQP KIVKWDRDM (SEQ ID NO:56).

В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи HLA класса I содержит аминокислотную последовательность: GSHSMRYFFTSVSRPGRGEP RFI A V G Y V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W I E Q E G P E Y W D G E T R K V K A H S Q T H R V D L G T L R G Y Y N Q S E A G S H T V Q R M Y G C D V G S D W R F L R G Y H Q Y A Y D G K D Y I A L K E D L R S W T A A D M A A Q T T K H K W E A A H V A E Q L R A Y L E G T C V E W L R R Y L E N G K E T L Q R T D A P K T H M T H H A V S D H E A T L R C W A L S F Y P A E I T L T W Q R D G E D Q T Q D T E

LVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGQEQR~~Y~~TCHVQHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID NO:53).

В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи HLA класса I содержит аминокислотную последовательность:

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQE
GPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLR
GYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVE
WLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGED
QTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVVPSGQEQR~~Y~~TCHVQHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID NO:57).

В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи HLA класса I содержит аминокислотную последовательность:

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
WDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQ
YAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRY
LENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTE
LVETRPCGDGTFQKWAAVVVPSGQEQR~~Y~~TCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:58).

В некоторых случаях полипептид β 2M содержит следующую аминокислотную последовательность:

IQRTPKIQVY SCHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE
HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTLSPKIVKWDRDM (SEQ ID NO:56); а полипептид тяжелой цепи HLA класса I мультимерного полипептида по данному изобретению содержит следующую аминокислотную последовательность:

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQE
GPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLR
GYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVE
WLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGED
QTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVVPSGQEQR~~Y~~TCHVQHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID NO:57), где остатки Cys, которые подчеркнуты и выделены жирным шрифтом, образуют дисульфидную связь друг с другом в мультимерном полипептиде.

В некоторых случаях полипептид β 2M содержит аминокислотную последовательность:

QRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFS
KDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM (SEQ ID NO:56).

В некоторых случаях первый полипептид и второй полипептид TMMP по данному

изобретению дисульфидно связаны друг с другом посредством: i) остатка Cys, присутствующего в линкере, соединяющем пептидный эпитоп и полипептид β 2М в первой полипептидной цепи; и ii) остаток Cys, присутствующий в тяжелой цепи ГКГС класса I во второй полипептидной цепи. В некоторых случаях остаток Cys, присутствующий в тяжелой цепи ГКГС класса I, представляет собой Cys, введенный в качестве замены Y84C. В некоторых случаях линкер, соединяющий пептидный эпитоп и полипептид β 2М в первой полипептидной цепи, представляет собой GCGGS(G4S) n (SEQ ID NO:235), где n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9. Например, в некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность GCGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:236). В качестве другого примера, линкер содержит аминокислотную последовательность GCGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:237). Примеры дисульфидсвязанных первого и второго полипептидов мультимерного полипептида по данному изобретению схематически изображены на фиг. 7А–7D.

Каркасные полипептиды

ТММР может содержать полипептид Fc или может содержать другой подходящий каркасный полипептид.

Подходящие каркасные полипептиды включают каркасные полипептиды на основе антител и каркасы не на основе антител. Не основанные на антителах каркасы включают, например, альбумин, полипептид XTEN (удлиненный рекомбинантный), трансферрин, полипептид рецептора Fc, эластиноподобный полипептид (см., например, Hassouneh et al. (2012) *Methods Enzymol.* 502:215; например, полипептид, содержащий пентапептидную повторяющуюся единицу (Val-Pro-Gly-X-Gly; SEQ ID NO:59), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от пролина), альбумин-связывающий полипептид, шелкоподобный полипептид (см., например, Valluzzi et al. (2002) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357:165), шелк-эластиноподобный полипептид (SELP; см., например, Megeed et al. (2002) *Adv Drug Deliv Rev.* 54:1075), и тому подобное. Подходящие полипептиды XTEN включают, например, полипептиды, раскрытые в WO 2009/023270, WO 2010/091122, WO 2007/103515, US 2010/0189682 и US 2009/0092582; см. также Schellenberger et al. (2009) *Nat Biotechnol.* 27:1186). Пригодные полипептиды альбумина включают, например, человеческий сывороточный альбумин.

Подходящие каркасные полипептиды в некоторых случаях будут представлять собой полипептиды, увеличивающие время полужизни. Таким образом, в некоторых случаях подходящий каркасный полипептид увеличивает период полужизни *in vivo* (например, период полужизни в сыворотке) мультимерного полипептида по сравнению с контрольным мультимерным полипептидом, в котором отсутствует каркасный

полипептид. Например, в некоторых случаях каркасный полипептид увеличивает период полужизни *in vivo* (например, период полужизни в сыворотке) мультимерного полипептида по сравнению с контрольным мультимерным полипептидом, в котором отсутствует каркасный полипептид, на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 50%, в по меньшей мере около 2 раза, в по меньшей мере около 2,5 раза, в по меньшей мере около 5 раз, в по меньшей мере около 10 раз, в по меньшей мере около 25 раз, в по меньшей мере около 50 раз, в по меньшей мере около 100 раз или более чем в 100 раз. В качестве примера, в некоторых случаях полипептид Fc увеличивает период полужизни *in vivo* (например, период полужизни в сыворотке) мультимерного полипептида по сравнению с контрольным мультимерным полипептидом, в котором отсутствует полипептид Fc, на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 50%, в по меньшей мере около 2 раза, в по меньшей мере около 2,5 раза, в по меньшей мере около 5 раз, в по меньшей мере около 10 раз, в по меньшей мере около 25 раз, в по меньшей мере около 50 раз, в по меньшей мере около 100 раз или более чем в 100 раз.

Полипептиды Fc

В некоторых случаях первая и/или вторая полипептидная цепь мультимерного полипептида содержит полипептид Fc. Полипептид Fc мультимерного полипептида может представлять собой Fc IgG1 человека, Fc IgG2 человека, Fc IgG3 человека, Fc IgG4 человека и т.д. В некоторых случаях полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности к аминокислотной последовательности области Fc, изображенной на фиг. 2A–2G. В некоторых случаях область Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с полипептидом Fc IgG1 человека, представленным на фиг. 2A. В некоторых случаях область Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или 100% идентичности

аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с полипептидом Fc IgA человека, представленным на фиг. 2C; например, полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотами 1-234 полипептида Fc IgA человека, представленного на фиг. 2C.

В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2A (Fc IgG1 человека). В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2A (Fc IgG1 человека), за исключением замены N297 на аминокислоту, отличную от аспарагина. В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2C (Fc IgG1 человека, содержащий замену N297A). В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2A (Fc IgG1 человека), за исключением замены L234 на аминокислоту, отличную от лейцина. В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2A (Fc IgG1 человека), за исключением замены L235 на аминокислоту, отличную от лейцина.

В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2E. В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2F. В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2G (Fc IgG1 человека, содержащий замену L234A и замену L235A). В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2A (Fc IgG1 человека), за исключением замены P331 на аминокислоту, отличную от пролина; в некоторых случаях замена

представляет собой замену P331S. В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А (Fc IgG1 человека), за исключением замен в L234 и L235 на аминокислоты, отличные от лейцина. В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2А (Fc IgG1 человека), за исключением замен в L234 и L235 на аминокислоты, отличные от лейцина, и замены P331 на аминокислоту, отличную от пролина. В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, содержит аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2В (Fc IgG1 человека, содержащий замены L234F, L235E и P331S). В некоторых случаях полипептид Fc, присутствующий в мультимерном полипептиде, представляет собой полипептид Fc IgG1, который содержит замены L234А и L235А.

Линкеры

ТММР по данному изобретению может содержать один или более линкеров, причем один или более линкеров находятся между одним или более из: i) полипептида ГКГС класса I или класса II и полипептида Fc Ig, при этом такой линкер упоминается в данном документе как «L1»; ii) иммуномодулирующего полипептида и полипептида ГКГС класса I или класса II, при этом такой линкер обозначен в данном документе как «L2»; iii) первого иммуномодулирующего полипептида и второго иммуномодулирующего полипептида, причем такой линкер обозначен в данном документе как «L3»; iv) пептидного антигена («эпитопа») и полипептида ГКГС класса I или класса II; v) полипептида ГКГС класса I или класса II и димеризационного полипептида (например, первый или второй член димеризующей пары); и vi) димеризационного полипептида (например, первый или второй член димеризующей пары) и полипептида IgFc.

Подходящие линкеры (также называемые «спейсерами») могут быть легко выбраны и могут иметь любую из ряда подходящих длин, таких как от 1 аминокислоты до 25 аминокислот, от 3 аминокислот до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 до 12 аминокислот, в том числе от 4 до 10 аминокислот, от 5 до 9 аминокислот, от 6 до 8 аминокислот или от 7 до 8 аминокислот. Подходящий линкер может иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот в длину. В некоторых случаях линкер имеет длину от 25 аминокислот до 50 аминокислот, например, от 25 до 30, от 30 до 35, от 35 до 40, от 40 до 45 или от 45 до 50 аминокислот.

Типичные линкеры включают полимеры глицина (G)_n, полимеры глицина-серина (включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO:60) и (GGGS)_n (SEQ ID NO:61), где n

представляет собой целое число, по меньшей мере один), полимеры глицин-аланин, полимеры аланин-серин и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Могут быть использованы полимеры глицина и глицина-серина; как Gly, так и Ser относительно неструктурированы и, следовательно, могут служить нейтральной связью между компонентами. Могут быть использованы полимеры глицина; глицин получает доступ к значительно большему пространству ϕ - ψ , чем даже аланин, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). Типичные линкеры могут содержать аминокислотные последовательности, включающие, но не ограниченные ими, GGSG (SEQ ID NO:62), GGSGG (SEQ ID NO:63), GSGSG (SEQ ID NO:64), GSGGG (SEQ ID NO:65), GGGSG (SEQ ID NO:66), GSSSG (SEQ ID NO:67), и тому подобные. Иллюстративные линкеры могут включать, например, Gly(Ser₄)_n (SEQ ID NO:251), где n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность (GSSSS)_n (SEQ ID NO:68), где n равен 4. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность (GSSSS)_n (SEQ ID NO:68), где n равен 5. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO:69), где n равен 1. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO:69), где n равен 2. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO:69), где n равен 3. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO:69), где n равен 4. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO:69), где n равен 5. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO:69), где n равен 6. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO:69), где n равен 7. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO:69), где n равен 8. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO:69), где n равен 9. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO:69), где n равен 10. В некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность AAAGG (SEQ ID NO:70).

В некоторых случаях линкерный полипептид, присутствующий в первом полипептиде мультимерного полипептида по данному изобретению, содержит остаток цистеина, который может образовывать дисульфидную связь с остатком цистеина, присутствующим во втором полипептиде мультимерного полипептида по данному

изобретению. В некоторых случаях, например, подходящий линкер содержит аминокислотную последовательность GCGASGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:71). В качестве другого примера, подходящий линкер может содержать аминокислотную последовательность GCGGS(G4S)*n* (SEQ ID NO:235), где *n* равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9. Например, в некоторых случаях линкер содержит аминокислотную последовательность GCGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:236). В качестве другого примера, линкер содержит аминокислотную последовательность GCGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:237).

Эпитопы

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

Эпитоп, присутствующий в мультимерном полипептиде, представляет собой пептид, специфически связанный с Т-клеткой, то есть эпитоп специфически связанный с эпитоп-специфической Т-клеткой. Эпитоп-специфическая Т-клетка связывает эпитоп, имеющий контрольную аминокислотную последовательность, но по существу не связывает эпитоп, который отличается от контрольной аминокислотной последовательности. Например, эпитоп-специфическая Т-клетка связывает эпитоп, имеющий контрольную аминокислотную последовательность, и связывает эпитоп, который отличается от контрольной аминокислотной последовательности, если в целом имеет, аффинность, которая составляет менее, чем 10^{-6} М, менее, чем 10^{-5} М или менее, чем 10^{-4} М. Эпитоп-специфическая Т-клетка может связывать эпитоп, для которого она специфична, с аффинностью, составляющей по меньшей мере 10^{-7} М, по меньшей мере 10^{-8} М, по меньшей мере 10^{-9} М или по меньшей мере 10^{-10} М.

Подходящие эпитопы включают, но не ограничиваются ими, эпитопы, присутствующие в антигене, связанном с раком. Связанные с раком антигены известны в данной области техники; см., например, Cheever et al. (2009) *Clin. Cancer Res.* 15:5323. Связанные с раком антигены включают, но не ограничиваются ими, α -фолатный рецептор; карбоангидразы IX (CAIX); CD19; CD20; CD22; CD30; CD33; CD44v7/8; карциноэмбриональный антиген (CEA); эпителиальный гликопротеин-2 (EGP-2); эпителиальный гликопротеин-40 (EGP-40); фолат-связывающий белок (FBP); фетальный

ацетилхолиновый рецептор; ганглиозидный антиген GD2; Her2/neu; IL-13R-a2; легкую цепь каппа; LeY; молекулу клеточной адгезии L1; ассоциированный с меланомой антиген (MAGE); MAGE-A1; мезотелин; MUC1; лиганды NKG2D; онкофетальный антиген (h5T4); антиген стволовых клеток простаты (PSCA); простат-специфический мембранный антиген (PSMA); ассоциированный с опухолью гликопротеин-72 (TAG-72); рецептор фактора роста эндотелия сосудов-2 (VEGF-R2). См., например, Vigneron et al. (2013) *Cancer Immunity* 13:15 и Vigneron (2015) *BioMed Res. Int'l* Article ID 948501; и полипептид VIII рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (см., например, Wong et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2965 и Miao et al. (2014) *PLoSOne* 9:e94281). В некоторых случаях эпитоп представляет собой эпитоп антигена E7 вируса папилломы человека; см., например, Ramos et al. (2013) *J. Immunother.* 36:66.

В некоторых случаях подходящий пептидный эпитоп представляет собой пептидный фрагмент из от около 4 аминокислот до около 20 аминокислот (например, 4 аминокислоты (ак), 5 ак, 6 ак, 7 ак, 8 ак, 9 м, 10 ак, 11 ак, 12 ак, 13 ак, 14 ак, 15 ак, 16 ак, 17 ак, 18 ак, 19 ак или 20 ак в длину полипептида MUC1, полипептида вируса папилломы человека (HPV) E6, полипептида LMP2, полипептида HPV E7, полипептида рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) vIII, полипептида HER-2/neu, полипептида 3 семейства антигенов меланомы A (MAGE A3), полипептида p53, полипептида мутанта p53, полипептида NY-ESO-1, полипептида фолат гидролазы (простат-специфический мембранный антиген; PSMA), полипептида карциноэмбрионального антигена (CEA), полипептида антигена меланомы, распознаваемого Т-клетками (melanA/MART1), полипептида Ras, полипептида gp100, полипептида протеиназы 3 (PR1), полипептида bcr-abl, полипептида тирозиназы, полипептида сурвивина, полипептида простат-специфического антигена (PSA), полипептида hTERT, полипептида точек разрыва саркомы, полипептида точек разрыва сновальной саркомы X (SSX), полипептида EphA2, полипептида кислой фосфатазы простаты (PAP), полипептида ингибитора апоптоза меланомы a (ML-IAP), полипептида альфа-фетопротеина (AFP), полипептида молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM), полипептида ERG (химерный TMPRSS2 ETS), полипептида NA17, полипептида парная коробка-3 (PAX3), полипептида киназы анапластической лимфомы (ALK), полипептида андрогенного рецептора, полипептида циклина B1, полипептида N-мус прото-онкогена (MYCN), полипептида члена семейства C гомологов гена Ras (RhoC), полипептида родственного тирозиназе белка-2 (TRP-2), полипептида мезотелина, полипептида антигена стволовых клеток простаты (PSCA), полипептида связанного с меланомой антигена-1 (MAGE A1), полипептида цитохрома P450 1B1 (CYP1B1), полипептида плацента-специфического белка 1 (PLAC1),

полипептида BORIS (также известного как фактор связывания CCCTC или CTCF), полипептида ETV6-AML, полипептида антигена рака молочной железы NY-BR-1 (также упоминаемого как белок, содержащий домен анкиринового повтора 30A), полипептида регулятора сигналинга G-белка (RGS5), полипептида антигена плоскоклеточного рака, распознаваемого Т-клетками (SART3), полипептида карбоангидразы IX, полипептида парной коробки-5 (PAX5), полипептида OY-TES1 (яичковый антиген; также известный как белок, связывающий акрозин), полипептида белка спермы 17, полипептида специфичной для лимфоцитов клеточной протеин-тирозинкиназы (LCK), высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMW-MAA), якорного белка А-киназы-4 (AKAP-4), полипептида точки останова X 2 синовиальной саркомы (SSX2), полипептида члена семейства антигена X 1 (XAGE1), полипептида гомолога 3 B7 (B7H3; также известного как CD276), полипептида бобовых (LGMN1; также известного как аспарагинилэндопептидаза), полипептида тирозинкиназы с доменами гомологии Ig и EGF-2 (Tie-2; также известного как рецептор ангиопоэтина-1), полипептида члена 4 семейства Р антигена (PAGE4), полипептида рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGF2), полипептида MAD-CT-1, полипептида белка активации фибробластов (FAP), полипептида бета-рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR β), полипептида MAD-CT-2, полипептида связанного с Fos антигена 1 (FOSL) или полипептида опухоли Вильямса-1 (WT-1).

Аминокислотные последовательности антигенов, связанных с раком, известны в данной области; см., например, MUC1 (GenBank CAA56734); LMP2 (GenBank CAA47024); HPV E6 (GenBank AAD33252); HPV E7 (GenBank AHG99480); EGFRvIII (GenBank NP_001333870); HER-2/neu (GenBank AAI67147); MAGE-A3 (GenBank AAH11744); p53 (GenBank BAC16799); NY-ESO-1 (GenBank CAA05908); PSMA (GenBank AAH25672); CEA (GenBank AAA51967); melan/MART1 (GenBank NP_005502); Ras (GenBank NP_001123914); gp100 (GenBank AAC60634); bcr-abl (GenBank AAB60388); тирозиназа (GenBank AAB60319); сурвивин (GenBank AAC51660); PSA (GenBank CAD54617); hTERT (GenBank BAC11010); SSX (GenBank NP_001265620); Eph2A (GenBank NP_004422); PAP (GenBank AAH16344); ML-IAP (GenBank AAH14475); AFP (GenBank NP_001125); EpCAM (GenBank NP_002345); ERG (химерный TMPRSS2 ETS) (GenBank ACA81385); PAX3 (GenBank AAI01301); ALK (GenBank NP_004295); андрогенный рецептор (GenBank NP_000035); циклин B1 (GenBank CAO99273); MYCN (GenBank NP_001280157); RhoC (GenBank AAH52808); TRP-2 (GenBank AAC60627); мезотелин (GenBank AAH09272); PSCA (GenBank AAH65183); MAGE A1 (GenBank NP_004979); CYP1B1 (GenBank AAM50512); PLAC1 (GenBank AAG22596); BORIS (GenBank NP_001255969); ETV6

(GenBank NP_001978); NY-BR1 (GenBank NP_443723); SART3 (GenBank NP_055521); карбоангидраза IX (GenBank EAW58359); PAX5 (GenBank NP_057953); OY-TE51 (GenBank NP_115878); белок спермы 17 (GenBank AAK20878); LCK (GenBank NP_001036236); HMW-MAA (GenBank NP_001888); AKAP-4 (GenBank NP_003877); SSX2 (GenBank CAA60111); XAGE1 (GenBank NP_001091073; XP_001125834; XP_001125856 и XP_001125872); B7H3 (GenBank NP_001019907; XP_947368; XP_950958; XP_950960; XP_950962; XP_950963; XP_950965 и XP_950967); LGMN1 (GenBank NP_001008530); TIE-2 (GenBank NP_000450); PAGE4 (GenBank NP_001305806); VEGFR2 (GenBank NP_002244); MAD-CT-1 (GenBank NP_005893 NP_056215); FAP (GenBank NP_004451); PDGF β (GenBank NP_002600); MAD-CT-2 (GenBank NP_001138574); FOSL (GenBank NP_005429) и WT-1 (GenBank NP_000369). Эти полипептиды также обсуждаются, например, в Cheever et al. (2009) *Clin. Cancer Res.* 15:5323, и в цитируемых там ссылках; Wagner et al. (2003) *J. Cell. Sci.* 116:1653; Matsui et al. (1990) *Oncogene* 5:249; Zhang et al. (1996) *Nature* 383:168;

В некоторых случаях эпитоп представляет собой HPV16E7/82-90 (LLMGTLGIV; SEQ ID NO:72). В некоторых случаях эпитоп представляет собой HPV16E7/86-93 (TLGIVCPI; SEQ ID NO:73). В некоторых случаях эпитоп представляет собой HPV16E7/11-20 (YMLDLQPETT; SEQ ID NO:74). В некоторых случаях эпитоп представляет собой HPV16E7/11-19 (YMLDLQPET; SEQ ID NO:75). См., например, Rensing et al. ((1995) *J. Immunol.* 154:5934) для дополнительных подходящих эпитопов HPV.

Иммуномодулирующие полипептиды

Подходящие иммуномодулирующие домены, которые проявляют пониженную аффинность к ко-иммуномодулирующему домену, могут иметь от 1 аминокислотного (ак) до 20 ак отличий от иммуномодулирующего домена дикого типа. Например, в некоторых случаях вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующий в ТММР по данному изобретению, отличается по аминокислотной последовательности на 1 ак, 2 ак, 3 ак, 4 ак, 5 ак, 6 ак, 7 ак, 8 ак, 9 ак или 10 ак от соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа. В качестве другого примера, в некоторых случаях вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующий в ТММР по данному изобретению, отличается по аминокислотной последовательности на 11 ак, 12 ак, 13 ак, 14 ак, 15 ак, 16 ак, 17 ак, 18 ак, 19 ак или 20 ак от соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа. В качестве примера, в некоторых случаях вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующий в ТММР по данному изобретению, содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен по сравнению

присутствующий в ТММР по данному изобретению, содержит 18 аминокислотных замен (например, не более 18 аминокислотных замен) по сравнению с соответствующим эталонным (например, диким типом) иммуномодулирующим полипептидом.

В некоторых случаях вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующий в ТММР по данному изобретению, содержит 19 аминокислотных замен (например, не более 19 аминокислотных замен) по сравнению с соответствующим эталонным (например, диким типом) иммуномодулирующим полипептидом.

В некоторых случаях вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующий в ТММР по данному изобретению, содержит 20 аминокислотных замен (например, не более 20 аминокислотных замен) по сравнению с соответствующим эталонным (например, диким типом) иммуномодулирующим полипептидом.

Как обсуждалось выше, вариант иммуномодулирующего полипептида, подходящий для включения в ТММР по данному изобретению, проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду.

Типичные пары иммуномодулирующего полипептида и когнатного ко-иммуномодулирующего полипептида включают, но не ограничиваются ими:

- a) 4-1BBL (иммуномодулирующий полипептид) и 4-1BB (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);
- b) PD-L1 (иммуномодулирующий полипептид) и PD1 (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);
- c) IL-2 (иммуномодулирующий полипептид) и рецептор IL-2 (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);
- d) CD80 (иммуномодулирующий полипептид) и CD86 (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);
- e) CD86 (иммуномодулирующий полипептид) и CD28 (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);
- f) OX40L (CD252) (иммуномодулирующий полипептид) и OX40 (CD134) когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);
- g) лиганд Fas (иммуномодулирующий полипептид) и Fas (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);
- h) ICOS-L (иммуномодулирующий полипептид) и ICOS (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);
- i) ICAM (иммуномодулирующий полипептид) и LFA-1 (когнатный ко-

иммуномодулирующий полипептид);

j) CD30L (иммуномодулирующий полипептид) и CD30 (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);

k) CD40 (иммуномодулирующий полипептид) и CD40L (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);

l) CD83 (иммуномодулирующий полипептид) и CD83L (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);

m) HVEM (CD270)(иммуномодулирующий полипептид) и CD160 (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);

n) JAG1 (CD339)(иммуномодулирующий полипептид) и Notch (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);

o) JAG1 (иммуномодулирующий полипептид) и CD46 (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);

p) CD80 (иммуномодулирующий полипептид) и CTLA4 (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид);

q) CD86 (иммуномодулирующий полипептид) и CTLA4 (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид); и

r) CD70 (иммуномодулирующий полипептид) и CD27 (когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид).

В некоторых случаях, вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующий в ТММР по данному изобретению имеет аффинность связывания с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом, которая составляет от 100 нМ до 100 мкМ. Например, в некоторых случаях, вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующий в ТММР по данному изобретению имеет аффинность связывания с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом, которая составляет от около 100 нМ до 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, до около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ.

Вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующий в ТММР по данному изобретению, проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-

иммуномодулирующему полипептиду. Подобным образом, ТММР по данному изобретению, который содержит вариант иммуномодулирующего полипептида, проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду. Таким образом, например, ТММР по данному изобретению, который содержит вариант иммуномодулирующего полипептида, имеет аффинность связывания для когнатного ко-иммуномодулирующего полипептида, которая составляет от 100 нМ до 100 мкМ. Например, в некоторых случаях, ТММР по данному изобретению, содержащий вариант иммуномодулирующего полипептида, имеет аффинность связывания с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом, которая составляет от около 100 нМ до 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, до около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ.

Варианты PD-L1

В качестве одного неограничивающего примера, в некоторых случаях вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующего в ТММР по данному изобретению, представляет собой вариант полипептида PD-L1. PD-L1 дикого типа связывается с PD1.

Полипептид PD-L1 человека дикого типа может содержать следующую аминокислотную последовательность: MRIFAVFIFM TYWHELLNAFT VTPKDLVYV EYGSNMTEIC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVDPVTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPGNI LNVSIIKICLT LSPST (SEQ ID NO:1).

Эктодомен PD-L1 человека дикого типа может содержать следующую аминокислотную последовательность: FT VTPKDLVYV EYGSNMTEIC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVDPVTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPGNI LNVSIIKI (SEQ ID NO:2).

Полипептид PD-1 дикого типа может содержать следующую аминокислотную последовательность: PGWFLDSPDR PWNPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (SEQ ID NO:3). В некоторых случаях, когда TMMP по данному изобретению содержит вариант полипептида PD-L1, «когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид» представляет собой полипептид PD-1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 проявляет пониженную аффинность связывания к PD-1 (например, полипептиду PD-1, содержащему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3), по сравнению с аффинностью связывания полипептида PD-L1, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Например, в некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 по данному изобретению связывает PD-1 (например, полипептид PD-1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3) с аффинностью связывания, которая на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50% по меньшей мере 55% меньше, по меньшей мере, на 60% меньше, по меньшей мере, на 65% меньше, по меньшей мере 70% меньше, по меньшей мере 75% меньше, по меньшей мере 80% меньше, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% меньше, или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания полипептида PD-L1, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 обладает аффинностью связывания с PD-1, которая составляет от 1 нМ до 1 мМ. В некоторых случаях, вариант полипептида PD-L1, присутствующий в TMMP по данному изобретению имеет аффинность связывания с PD-1, которая составляет от 100 нМ до 100 мкМ. В качестве другого примера, в некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 имеет аффинность связывания с PD1 (например, полипептидом PD1, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3), которая составляет от около 100 нМ до 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от

около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, до около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ.

В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 имеет одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью PD-L1, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 имеет от 2 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью PD-L1, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 имеет 2 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью PD-L1, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 имеет 3 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью PD-L1, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 имеет 4 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью PD-L1, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 имеет 5 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью PD-L1, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 имеет 6 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью PD-L1, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 имеет 7 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью PD-L1, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 имеет 8 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью PD-L1, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 имеет 9 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью PD-L1, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях вариант полипептида PD-L1 имеет 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью PD-L1, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Подходящий вариант PD-L1 включает полипептид, который содержит аминокислотную последовательность имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности

аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью:

FT VTVPKXLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG
EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG
ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS
DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPGNI
LNVSIIKI (SEQ ID NO:76), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp. В некоторых случаях X представляет собой Ala. В некоторых случаях X представляет собой Arg.

Подходящий вариант PD-L1 включает полипептид, который содержит аминокислотную последовательность имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью:

FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALXVYWEME DKNIIQFVHG
EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG
ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS
DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPGNI
LNVSIIKI (SEQ ID NO:77), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ile. В некоторых случаях X представляет собой Asp.

Подходящий вариант PD-L1 включает полипептид, который содержит аминокислотную последовательность имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности со следующей аминокислотной последовательностью:

FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG
EDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG
ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS
DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPGNI
LNVSIIKI (SEQ ID NO:78), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Glu. В некоторых случаях X представляет собой Arg.

Варианты CD80

В некоторых случаях вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующего в TMMP по данному изобретению, представляет собой вариант полипептида CD80. CD80 дикого типа связывается с CD28. CD80 дикого типа также

связывается с CD86.

Аминокислотная последовательность дикого типа эктодомена CD80 человека может быть следующей:

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVLELA QTRIWQKEK KMVLTMMMSGD
MNIWPEYKNR TIFDITNLS IVILALRPSD EGTYESVVLK YEKDAFKREN
LAEVTLVKA DFPTPSISDF EIPTSNIIRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
ID NO:4).

Аминокислотная последовательность CD28 дикого типа может быть следующей:

MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE
FRASLHKGLD SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNEVTFYQLQ
NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS
KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG
PTRKHYPYA PPRDFAAYRS (SEQ ID NO:5). В некоторых случаях, когда TMMP по
данному изобретению содержит вариант полипептида CD80, «когнатный ко-
иммуномодулирующий полипептид» представляет собой полипептид CD28, содержащий
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

Аминокислотная последовательность CD28 дикого типа может быть следующей:

MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSW KHLCPSPFLP
GPSKPFWVLV VVGGVLACYS LLVTVAFIIF WVRSKRSRLL HSDYMNMTPR
RPGPTRKHYPY APPRDFAA YRS (SEQ ID NO:6).

Аминокислотная последовательность CD28 дикого типа может быть следующей:

MLRLLLALNL FPSIQVTGKH LCPSPLFPGP SKPFWVLVVV GGVACYSLL
VTVAFIIFWV RSKRSRLLHS DYMNMTPRRP GPTRKHYPY APPRDFAA YRS (SEQ ID
NO:7).

В некоторых случаях вариант полипептида CD80 проявляет пониженную
аффинность связывания с полипептидом CD28 по сравнению с аффинностью связывания
полипептида CD80, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в
SEQ ID NO: 4, с CD28. Например, в некоторых случаях вариант полипептида CD80
связывает CD28 с аффинностью связывания, которая на по меньшей мере 10%, по
меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%,
по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере
50% по меньшей мере 55% меньше, по меньшей мере, на 60% меньше, по меньшей мере,
на 65% меньше, по меньшей мере 70% меньше, по меньшей мере 75% меньше, по
меньшей мере 80% меньше, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей

мере 95% меньше, или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания полипептида CD80, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, с CD28 (например, полипептидом CD28, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO:5, 6 или 7).

В некоторых случаях, вариант полипептида CD80 имеет аффинность связывания с CD28, которая составляет от 100 нМ до 100 мкМ. В качестве другого примера, в некоторых случаях вариант полипептида CD80 по данному изобретению имеет аффинность связывания с CD28 (например, полипептидом CD28, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO: 7), которая составляет от около 100 нМ до 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, до около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ.

В некоторых случаях вариант полипептида CD80 имеет одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью CD80, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях вариант полипептида CD80 имеет от 2 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD80, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях вариант полипептида CD80 имеет 2 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD80, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях вариант полипептида CD80 имеет 3 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD80, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях вариант полипептида CD80 имеет 4 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD80, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях вариант полипептида CD80 имеет 5 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD80, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях вариант полипептида CD80 имеет 6 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD80, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях вариант полипептида CD80 имеет 7 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD80, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях вариант полипептида CD80 имеет 8

аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD80, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях вариант полипептида CD80 имеет 9 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD80, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях вариант полипептида CD80 имеет 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD80, представленной в SEQ ID NO: 4.

Подходящие варианты CD80 включают полипептид, который содержит аминокислотную последовательность имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с одной из следующих аминокислотных последовательностей:

VIHVTK EVKEVATLSC GHXVSVEELA QTRIWQKEK KMVLTMMMSGD
MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYECVVLK YEKDAFKREN
LAEVTLVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
ID NO:79), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asn. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIWQKEK KMVLTMMMSGD
MNIWPEYKNR TIFDITXNLS IVILALRPSD EGTYECVVLK YEKDAFKREN
LAEVTLVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
ID NO:80), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asn. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIWQKEK KMVLTMMMSGD
MNIWPEYKNR TIFDITNNLS XVILALRPSD EGTYECVVLK YEKDAFKREN
LAEVTLVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
ID NO:81), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ile. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIWQKEK KMVLTMMMSGD
MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYECVVLX YEKDAFKREN
LAEVTLVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
ID NO:82), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Lys. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KMVLTMMSGD
 MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTIECVVLK YEKDAFKREH
 LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
XDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
 ID NO:83), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В
 некоторых случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KMVLTMMSGD
 MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTIECVVLK YEKDAFKREH
 LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
 QXPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
 ID NO:84), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp. В
 некоторых случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEEXA QTRIIYWQKEK KMVLTMMSGD
 MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTIECVVLK YEKDAFKREH
 LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
 QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
 ID NO:85), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В
 некоторых случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIXWQKEK KMVLTMMSGD
 MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTIECVVLK YEKDAFKREH
 LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
 QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
 ID NO:86), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Tyr. В некоторых
 случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWXKEK KMVLTMMSGD
 MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTIECVVLK YEKDAFKREH
 LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
 QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
 ID NO:87), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В
 некоторых случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KXVLTMMSGD
 MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTIECVVLK YEKDAFKREH
 LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
 QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
 ID NO:88), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Met. В

некоторых случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KMXLTMMSGD
 MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH
 LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
 QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
 ID NO:89), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Val. В некоторых
 случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KMVLTMMSGD
 MNXWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH
 LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
 QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
 ID NO:90), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ile. В некоторых
 случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KMVLTMMSGD
 MNIWPEXKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH
 LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
 QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
 ID NO:91), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Tyr. В некоторых
 случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KMVLTMMSGD
 MNIWPEYKNR TIFXITNNLS IVILALRPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH
 LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
 QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
 ID NO:92), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp. В
 некоторых случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KMVLTMMSGD
 MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH
 LAEVTLSVKA DXPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
 QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
 ID NO:93), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe. В
 некоторых случаях, X представляет собой Ala;

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KMVLTMMSGD
 MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH
 LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVX
 QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ

ID NO:94), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ser. В некоторых случаях X представляет собой Ala; и

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVVEELA QTRIWQKEK KMVLTMMSGD
MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYESVVLK YEKDAFKREN
LAEVTLVKA DFPTX^USISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS
QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ
ID NO:95), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Pro. В некоторых случаях X представляет собой Ala.

Варианты CD86

В некоторых случаях вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующего в TMMP по данному изобретению, представляет собой вариант полипептида CD86. CD86 дикого типа связывается с CD28. В некоторых случаях, когда TMMP по данному изобретению содержит вариант полипептида CD86, «когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид» представляет собой полипептид CD28, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

Аминокислотная последовательность полного эктодомена CD86 дикого типа человека может быть следующей:

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSK
YMN^UR^UTSF^USDS^UW^UT^ULR^ULH^UNLQIKDKGLYQCIIH^UKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPEI
VPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLR^UTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISL
SVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (SEQ ID NO:8).

Аминокислотная последовательность домена IgV CD86 дикого типа человека может быть следующей:

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSK
YMN^UR^UTSF^USDS^UW^UT^ULR^ULH^UNLQIKDKGLYQCIIH^UKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID
NO:9).

В некоторых случаях вариант полипептида CD86 проявляет пониженную аффинность связывания с полипептидом CD28 по сравнению с аффинностью связывания полипептида CD86, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:9 с CD28. Например, в некоторых случаях вариант полипептида CD86 связывает CD28 с аффинностью связывания, которая на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50% по меньшей мере 55% меньше, по меньшей мере, на 60% меньше, по меньшей мере, на 65% меньше, по меньшей мере 70% меньше, по меньшей мере 75%

меньше, по меньшей мере 80% меньше, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% меньше, или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания полипептида CD86, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9, с CD28 (например, полипептидом CD28, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 5, 6 или 7).

В некоторых случаях, вариант полипептида CD86 имеет аффинность связывания с CD28, которая составляет от 100 нМ до 100 мкМ. В качестве другого примера, в некоторых случаях вариант полипептида CD86 по данному изобретению имеет аффинность связывания с CD28 (например, полипептидом CD28, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, 6 или 7), которая составляет от около 100 нМ до 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, до около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ.

В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет от 2 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 2 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 3 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 4 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 5 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 6 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 7 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 8

аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 9 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 10 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 8.

В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет от 2 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 2 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 3 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 4 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 5 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 6 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 7 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 8 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 9 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях вариант полипептида CD86 имеет 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью CD86, представленной в SEQ ID NO: 9.

Подходящие варианты CD86 включают полипептид, который содержит аминокислотную последовательность имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с одной из следующих аминокислотных последовательностей:

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSD

VHSKYMXRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANF
SQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYD
VSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPDHIP (SEQ ID NO:96), где
X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp. В некоторых случаях, X
представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
VHSKYMNRTSFXSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANF
SQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYD
VSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPDHIP (SEQ ID NO:97), где
X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp. В некоторых случаях, X
представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
VHSKYMNRTSFDSDSXTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFS
QPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYD
VSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPDHIP (SEQ ID NO:98), где
X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Trp. В некоторых случаях, X
представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
VHSKYMNRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHXKKPTGMIRIHQMNSELSVLANF
SQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYD
VSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPDHIP (SEQ ID NO:99), где
X представляет собой любую аминокислоту, отличную от His. В некоторых случаях, X
представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
VHSKYMXRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL
(SEQ ID NO:100), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp. В
некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
VHSKYMNRTSFXSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL
(SEQ ID NO:101), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp. В
некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
VHSKYMNRTSFDSDSXTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ
ID NO:102), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Trp. В
некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWQDQENLV LNEVYLGKEKFDS
 VHSKYMNR TSDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIИHXKKPTGMIRIHQMNSELSVL
 (SEQ ID NO:103), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от His. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWQDQENLV LNEVYLGKEKFDS
 VHSKYMNR TSDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIИHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANF
 SQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLR TKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYD
 VSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (SEQ ID NO:104), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Val. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWQDQENLV LNEVYLGKEKFDS
 VHSKYMNR TSDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIИHKKPTGMIRIHQMNSELSVL
 (SEQ ID NO:105), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Val. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWXDQENLV LNEVYLGKEKFDS
 VHSKYMNR TSDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIИHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANF
 SQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLR TKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYD
 VSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (SEQ ID NO:106), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWXDQENLV LNEVYLGKEKFDS
 VHSKYMNR TSDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIИHKKPTGMIRIHQMNSELSVL
 (SEQ ID NO:107), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VXWQDQENLV LNEVYLGKEKFDS
 VHSKYMNR TSDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIИHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANF
 SQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLR TKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYD
 VSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (SEQ ID NO:108), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VXWQDQENLV LNEVYLGKEKFDS
 VHSKYMNR TSDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIИHKKPTGMIRIHQMNSELSVL
 (SEQ ID NO:109), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWQDQENLV LNEVYLGKEKFDS

VH SKYMNRTSFDSDSWTXRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANF
 SQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYD
 VSISLSVSFPDVTSNM TIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (SEQ ID NO:110), где
 X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X
 представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
 VH SKYMNRTSFDSDSWTXRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL
 (SEQ ID NO:111), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В
 некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
 VH SKXMNRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANF
 SQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYD
 VSISLSVSFPDVTSNM TIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (SEQ ID NO:112), где
 X представляет собой любую аминокислоту, кроме Tug. В некоторых случаях, X
 представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
 VH SKXMNRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL
 (SEQ ID NO:113), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Tug. В
 некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
 VH SKYMXRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHXKKPTGMIRIHQMNSELSVLANF
 SQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYD
 VSISLSVSFPDVTS_HMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (SEQ ID NO:114), где
 первый X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asn, а второй X
 представляет собой любую аминокислоту, отличную от His. В некоторых случаях первый
 и второй X оба представляют собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
 VH SKYMXRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHXKKPTGMIRIHQMNSELSVL
 (SEQ ID NO:115), где первый X представляет собой любую аминокислоту, отличную от
 Asn, а второй X представляет собой любую аминокислоту, отличную от His. В некоторых
 случаях первый и второй X оба представляют собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
 VH SKYMNRTSFX₁SDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHX₂KKPTGMIRIHQMNSELSVLAN
 FSQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELY
 DVSI SLSVSFPDVTSNM TIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (SEQ ID NO:116),

где X_1 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp, а X_2 представляет собой любую аминокислоту, отличную от His . В некоторых случаях, X_1 представляет собой Ala, а X_2 представляет собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
VHSKYMNRTSFX₁SDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHX₂KKPTGMIRIHQMNSELSVL
(SEQ ID NO:117), где первый X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asn, а второй X представляет собой любую аминокислоту, отличную от His. В некоторых случаях первый и второй X оба представляют собой Ala;

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
VHSKYMX₁RTSFX₂SDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHX₃KKPTGMIRIHQMNSELSVLA
NFSQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKMSVLLRRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTEL
YDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSPPFSIELEDPQPPDHIP (SEQ ID NO:118),
где X_1 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asn, X_2 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp, а X_3 представляет собой любую аминокислоту, отличную от His . В некоторых случаях, X_1 представляет собой Ala, X_2 представляет собой Ala, а X_3 представляет собой Ala; и

APLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDS
VHSKYMX₁RTSFX₂SDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHX₃KKPTGMIRIHQMNSELSVL
(SEQ ID NO:119), где X_1 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asn, X_2 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp, а X_3 представляет собой любую аминокислоту, отличную от His. В некоторых случаях, X_1 представляет собой Ala, X_2 представляет собой Ala, а X_3 представляет собой Ala.

Варианты 4-1BBL

В некоторых случаях вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующего в TMMP по данному изобретению, представляет собой вариант полипептида 4-1BBL. 4-1BBL дикого типа связывается с 4-1BB (CD137).

Аминокислотная последовательность 4-1BBL дикого типа может быть следующей:
MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA
CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV
LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR
RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ
GRLHLHSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE
(SEQ ID NO:10).

В некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL представляет собой вариант домена гомологии (THD) фактора некроза опухоли (ФНО) 4-1BBL человека.

Аминокислотная последовательность дикого типа THD 4-1BBL человека может представлять собой, например, одну из SEQ ID NO:11-13, т.е. следующую:

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:11).

D PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:12).

D PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL
RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA
RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPA (SEQ ID NO:13).

Аминокислотная последовательность 4-1BB дикого типа может быть следующей:
MGNSCYNIVA TLLLVNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP
NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS
MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG
TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF
SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG CSCRFPEEEE GGCEL (SEQ ID NO:14). В
некоторых случаях, когда TMMP по данному изобретению содержит вариант полипептида
4-1BBL, «когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид» представляет собой
полипептид 4-1BB, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

В некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL проявляет пониженную
аффинность связывания с полипептидом 4-1BB по сравнению с аффинностью связывания
полипептида 4-1BBL, содержащего аминокислотную последовательность,
представленную в SEQ ID NO:10-13. Например, в некоторых случаях вариант
полипептида 4-1BBL по данному изобретению связывает 4-1BB с аффинностью
связывания, которая на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере
20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей
мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50% по меньшей мере 55% меньше по
меньшей мере, на 60% меньше, по меньшей мере, на 65% меньше, по меньшей мере 70%
меньше, по меньшей мере 75% меньше, по меньшей мере 80% меньше, по меньшей мере
85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% меньше, или более чем на 95% меньше,
чем аффинность связывания полипептида 4-1BBL, содержащего аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10-13, с полипептидом 4-1BB (например, полипептидом 4-1BB, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO:14), при анализе в одинаковых условиях.

В некоторых случаях, вариант полипептида 4-1BBL имеет аффинность связывания с 4-1BB, которая составляет от 100 нМ до 100 мкМ. В качестве другого примера, в некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL имеет аффинность связывания с 4-1BB (например, полипептидом 4-1BB, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14), которая составляет от около 100 нМ до 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, до около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ.

В некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL имеет одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью 4-1BBL, представленной в одной из SEQ ID NO: 10 -13. В некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL имеет от 2 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью 4-1BBL, представленной в одной из SEQ ID NO: 10 -13. В некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL имеет 2 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью 4-1BBL, представленной в одной из SEQ ID NO: 10 -13. В некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL имеет 3 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью 4-1BBL, представленной в одной из SEQ ID NO: 10 -13. В некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL имеет 4 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью 4-1BBL, представленной в одной из SEQ ID NO: 10 -13. В некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL имеет 5 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью 4-1BBL, представленной в одной из SEQ ID NO: 10 -13. В некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL имеет 6 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью 4-1BBL, представленной в одной из SEQ ID NO: 10 -13. В некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL имеет 7 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью 4-1BBL, представленной в одной из SEQ ID NO: 10 -13. В некоторых случаях вариант полипептида

4-1BBL имеет 8 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью 4-1BBL, представленной в одной из SEQ ID NO: 10 -13. В некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL имеет 9 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью 4-1BBL, представленной в одной из SEQ ID NO: 10 -13. В некоторых случаях вариант полипептида 4-1BBL имеет 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью 4-1BBL, представленной в одной из SEQ ID NO: 10 -13.

Подходящие варианты 4-1BBL включают полипептид, который содержит аминокислотную последовательность имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с одной из следующих аминокислотных последовательностей:

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYXEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
 GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:120), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Lys. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWXLTQ
 GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:121), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG XF AQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
 GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:122), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Met. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MXAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
 GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:123), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAXLV AQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:124), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQXV AQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:125), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLXAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:126), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Val. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAXNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:127), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAXNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:128), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asn. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNX LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:129), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Val. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV XLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:130), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LXIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:131), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLXDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:132), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ile. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIXGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:133), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDXPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:134), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gly. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGXLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:135), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Pro. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPXSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:136), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLXWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:137), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ser. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSXY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:138), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Trp. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWX SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:139), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Tyr. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY X DPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:140), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ser. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SX PGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:141), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDXGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:142), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Pro. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPXLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:143), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gly. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGXAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:144), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAXVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:145), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gly. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGXSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:146), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Val. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVXL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:147), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ser. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSX TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:148), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL XGGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:149), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Thr. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TXGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:150), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gly. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGXLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:151), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gly. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGXSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:152), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLXYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:153), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ser. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSXKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:154), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Tyr. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKXDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:155), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Glu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKXT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:156), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDX
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:157), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Thr. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
XELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:158), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Lys. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KXLVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:159), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Glu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVXFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:160), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFXQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:161), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFXLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:162), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQXELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:163), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLXLR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:164), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Glu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLEXR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:165), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELX RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:166), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Arg. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR XVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:167), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Arg. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RXVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:168), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Val. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVXAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:169), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Val. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAXEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:170), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gly. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGXGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:171), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Glu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEXSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:172), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gly. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGXGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:173), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ser. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVXLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
 GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:174), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDXPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
 GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:175), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLXPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
 GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:176), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Pro. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPAXS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
 GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:177), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ser. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASX EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
 GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:178), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ser. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS XARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
 GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:179), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Glu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
 KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
 LTVDLPPASS EAXNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:180), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Arg. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARXSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:181), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asn. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNXAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:182), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Ser. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAXGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:183), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGX RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:184), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ XLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:185), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Arg. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RXGVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:186), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLXVHLHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:187), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gly. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGXH_LHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:188), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Val. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVX_LH_LHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:189), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от His. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVH_XH_LHTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:190), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVH_LXTEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:191), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от His. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVH_LH_XEA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:192), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Thr. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVH_LH_TXA RARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:193), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Glu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVH_LH_TEA XARHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:194), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Arg. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RAXHAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:195), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Arg. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARXAWQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:196), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от His. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAXQLTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:197), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Trp. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQXTQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:198), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Leu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLXQ

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:199), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Thr. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTX

GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:200), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ

XATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:201), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gly. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
GAXVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:202), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Thr. В некоторых случаях X представляет собой Ala; и

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT
KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA
LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
GATXLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:203), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Val. В некоторых случаях X представляет собой Ala.

Варианты IL-2

В некоторых случаях вариант иммуномодулирующего полипептида, присутствующего в TMMP по данному изобретению, представляет собой вариант полипептида IL-2. IL-2 дикого типа связывается с рецептором IL-2 (IL-2R), то есть гетеротримерным полипептидом, содержащим IL-2R α , IL-2R β и IL-2R γ .

Аминокислотная последовательность IL-2 дикого типа может быть следующей:
APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA
TELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNRWITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:15).

IL2 дикого типа связывается с рецептором IL2 (IL2R) на поверхности клетки. Рецептор IL2 представляет собой в некоторых случаях гетеротримерный полипептид, содержащий альфа-цепь (IL-2R α , также называемую CD25), бета-цепь (IL-2R β , также называемую CD122) и гамма-цепь (IL-2R γ , также называемую CD132). Аминокислотные последовательности IL-2R α , IL2R β и IL-2R γ человека могут быть следующими.

IL-2R α человека: ELCDDDPPE IPHATFKAMA YKEGTM LNCE CKRGFRRIKS
GSLYMLCTGN SSHSSWDNQC QCTSSATRNT TKQVTPQPEE QKERKTTEMQ
SPMQPVDQAS LPGHCREPPP WENEATERIY HFVVGQMVYY QCVQGYRALH
RGPAESVCKM THGKTRWTQP QLIC TGEMET SQFPGEEKPQ ASPEGRPESE
TSCLVTTTDF QIQTEMAATM ETSIFTTEYQ VAVAGCVFLL ISVLLLSGLT
WQRRQRKSRR TI (SEQ ID NO:16).

IL-2R β человека: VNG TSQFTCFYNS RANISCVWSQ DGALQDTSCQ
VHAWPDRRRW NQTCELLPVS QASWACNLIL GAPDSQKLTT VDIVTLRVLC
REGVRWRVMA IQDFKPFENL RLMAPISLQV VHVETHRCNI SWEISQASHY

FERHLEFEAR TLSPGHTWEE APLLTLLKQKQ EWICLETLTP DTQYEFQVRV
 KPLQGEFTTW SPWSQPLAFR TKPAALGKDT IPWLGHLLVG LSGAFGFIL
 VYLLINCRNT GPWLKKVLKC NTPDPSKFFS QLSSEHGGDV QKWLSSPFPS
 SSFSPGGLAP EISPLEVLER DKVTQLLLQQ DKVPEPASLS SNHSLTSCFT NQGYFFFHLP
 DALEIEACQV YFTYDPYSEE DPDEGVAGAP TGSSPQPLQP LSGEDDAYCT
 FPSRDDLLLF SPSLLGGPSP PSTAPGGSGA GEERMPPSLQ ERVPRDWDPO
 PLGPPTPGVP DLVDFQPPPE LVLREAGEEV PDAGPREGVS FPWSRPPGQG
 EFRALNARLP LNTDAYLSLQ ELQGQDPTHL V (SEQ ID NO:17).

IL-2R_γ человека: LNTTILTP NGNEDTTADF FLTTMPTDSL SVSTLPLPEV
 QCFVFNVEYM NCTWNSSEEP QPTNLTLHYW YKNSDNDKVQ KCSHYLFSEE
 ITSGCQLQKK EIHL YQTFVV QLQDPREPRR QATQMLKLQN LVIPWAPENL
 TLHKLSESQL ELNWNRRFLN HCLEHLVQYR TDWDHSWTEQ SVDYRHKFSL
 PSVDGQKRYT FRVRSRFNPL CGSAQHWSEW SHPIHWGSNT SKENPFLFAL
 EAVVISVGSM GLIISLLCVY FWLERTMPRI PTLKNLEDLV TEYHGNFSAW
 SGVSKGLAES LQPDYSERLC LVSEIPKGG ALGEGPGASP CNQHSPYWAP
 PCYTLKPET (SEQ ID NO:18).

В некоторых случаях, когда TMMP по данному изобретению содержит вариант полипептида IL-2, «когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид» представляет собой полипептид IL-2R, содержащий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, 17 и 18.

В некоторых случаях вариант полипептида IL-2 проявляет пониженную аффинность связывания с полипептидом IL-2R по сравнению с аффинностью связывания полипептида IL-2, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:15. Например, в некоторых случаях вариант полипептида IL-2 связывает IL-2R с аффинностью связывания, которая на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50% по меньшей мере 55% меньше по меньшей мере, на 60% меньше, по меньшей мере, на 65% меньше, по меньшей мере 70% меньше, по меньшей мере 75% меньше, по меньшей мере 80% меньше, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% меньше, или более чем на 95% меньше, чем аффинность связывания полипептида IL-2, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, с полипептидом IL-2R (например, полипептидом IL-2R, содержащим полипептид, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO:16-18), при анализе в одинаковых условиях.

В некоторых случаях, вариант полипептида IL-2 имеет аффинность связывания с IL-2R, которая составляет от 100 нМ до 100 мкМ. В качестве другого примера, в некоторых случаях вариант полипептида IL-2 имеет аффинность связывания с IL-2R (например, полипептидом IL-2R, содержащим полипептид, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16-18), которая составляет от около 100 нМ до 150 нМ, от около 150 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 250 нМ, от около 250 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 350 нМ, от около 350 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ, от около 900 нМ до около 1 мкМ, до около 1 мкМ до около 5 мкМ, от около 5 мкМ до около 10 мкМ, от около 10 мкМ до около 15 мкМ, от около 15 мкМ до около 20 мкМ, от около 20 мкМ до около 25 мкМ, от около 25 мкМ до около 50 мкМ, от около 50 мкМ до около 75 мкМ или от около 75 мкМ до около 100 мкМ.

В некоторых случаях вариант полипептида IL-2 имеет одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-2, представленной в SEQ ID NO: 15. В некоторых случаях вариант полипептида IL-2 имеет от 2 до 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-2, представленной в SEQ ID NO: 15. В некоторых случаях вариант полипептида IL-2 имеет 2 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-2, представленной в SEQ ID NO: 15. В некоторых случаях вариант полипептида IL-2 имеет 3 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-2, представленной в SEQ ID NO: 15. В некоторых случаях вариант полипептида IL-2 имеет 4 аминокислотные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-2, представленной в SEQ ID NO: 15. В некоторых случаях вариант полипептида IL-2 имеет 5 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-2, представленной в SEQ ID NO: 15. В некоторых случаях вариант полипептида IL-2 имеет 6 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-2, представленной в SEQ ID NO: 15. В некоторых случаях вариант полипептида IL-2 имеет 7 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-2, представленной в SEQ ID NO: 15. В некоторых случаях вариант полипептида IL-2 имеет 8 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-2, представленной в SEQ ID NO: 15. В некоторых случаях вариант полипептида IL-2 имеет 9 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-2, представленной в SEQ ID NO: 15. В некоторых случаях вариант полипептида IL-2 имеет 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-2,

представленной в SEQ ID NO: 15.

Подходящие варианты IL-2 включают полипептид, который содержит аминокислотную последовательность имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с одной из следующих аминокислотных последовательностей:

APTSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:19), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APTSSTKKT QLQLEHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:20), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APTSSTKKT QLQLXHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:21), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Glu. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APTSSTKKT QLQLEXLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:22), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от His. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APTSSTKKT QLQLEXLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:22), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от His. В некоторых случаях X представляет собой Ala. В некоторых случаях X представляет собой Arg. В некоторых случаях X представляет собой Asp. В некоторых случаях X представляет собой Cys. В некоторых случаях X представляет собой Glu. В некоторых случаях X представляет собой Gln. В некоторых случаях X представляет собой Gly. В некоторых случаях X представляет собой Ile. В некоторых случаях X представляет собой

Lys. В некоторых случаях X представляет собой Leu. В некоторых случаях X представляет собой Met. В некоторых случаях X представляет собой Phe. В некоторых случаях X представляет собой Pro. В некоторых случаях X представляет собой Ser. В некоторых случаях X представляет собой Thr. В некоторых случаях X представляет собой Tyr. В некоторых случаях X представляет собой Trp. В некоторых случаях X представляет собой Val;

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFXMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:23), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Tyr. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCXSIIS TLT (SEQ ID NO:24), где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях, X представляет собой Ala;

APTSSSTKKT QLQLEX₁LLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TX₂KFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:25), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, отличную от His, и где X₂ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe. В некоторых случаях X₁ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₂ представляет собой Ala. В некоторых случаях, X₁ представляет собой Ala, а X₂ представляет собой Ala;

APTSSSTKKT QLQLEHLLLX₁ LQMILNGINN YKNPKLTRML TX₂KFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:26), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp; и где X₂ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe. В некоторых случаях X₁ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₂ представляет собой Ala. В некоторых случаях, X₁ представляет собой Ala, а X₂ представляет собой Ala;

APTSSSTKKT QLQLX₁HLLLX₂ LQMILNGINN YKNPKLTRML TX₃KFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:27), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Glu; где X₂ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp; и где X₃ представляет собой любую аминокислоту,

отличную от Phe. В некоторых случаях X_1 представляет собой Ala. В некоторых случаях X_2 представляет собой Ala. В некоторых случаях X_3 представляет собой Ala. В некоторых случаях, X_1 представляет собой Ala, X_2 представляет собой Ala, а X_3 представляет собой Ala;

APTSSSTKKT QLQLEX X_1 LLL X_2 LQMILNGINN YKNPKLTRML T X_3 KFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:28), где X_1 представляет собой любую аминокислоту, отличную от His; где X_2 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp; и где X_3 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe. В некоторых случаях X_1 представляет собой Ala. В некоторых случаях X_2 представляет собой Ala. В некоторых случаях X_3 представляет собой Ala. В некоторых случаях, X_1 представляет собой Ala, X_2 представляет собой Ala, а X_3 представляет собой Ala;

APTSSSTKKT QLQLEHLLL X_1 LQMILNGINN YKNPKLTRML T X_2 KFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFC X_3 SIIS TLT (SEQ ID NO:29), где X_1 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp; где X_2 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe; и где X_3 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях X_1 представляет собой Ala. В некоторых случаях X_2 представляет собой Ala. В некоторых случаях X_3 представляет собой Ala. В некоторых случаях, X_1 представляет собой Ala, X_2 представляет собой Ala, а X_3 представляет собой Ala;

APTSSSTKKT QLQLEHLLL X_1 LQMILNGINN YKNPKLTRML T X_2 KF X_3 MPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:30), где X_1 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp; где X_2 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe; и где X_3 представляет собой любую аминокислоту, отличную от Tyr. В некоторых случаях X_1 представляет собой Ala. В некоторых случаях X_2 представляет собой Ala. В некоторых случаях X_3 представляет собой Ala. В некоторых случаях, X_1 представляет собой Ala, X_2 представляет собой Ala, а X_3 представляет собой Ala;

APTSSSTKKT QLQLEX X_1 LLL X_2 LQMILNGINN YKNPKLTRML T X_3 KF X_4 MPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:31), где X_1 представляет собой любую аминокислоту, отличную от His; где X_2 представляет собой любую

аминокислоту, отличную от Asp; где X₃ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe; и где X₄ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Tug. В некоторых случаях X₁ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₂ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₃ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₄ представляет собой Ala. В некоторых случаях, X₁ представляет собой Ala, X₂ представляет собой Ala, X₃ представляет собой Ala, а X₄ представляет собой Ala;

APTSSSTKKT QLQLEHLLLX₁ LQMILNGINN YKNPKLTRML TX₂KFX₃MPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCX₄SIIS TLT (SEQ ID NO:32), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp; где X₂ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe; где X₃ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Tug; и где X₄ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях X₁ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₂ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₃ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₄ представляет собой Ala. В некоторых случаях, X₁ представляет собой Ala, X₂ представляет собой Ala, X₃ представляет собой Ala, а X₄ представляет собой Ala;

APTSSSTKKT QLQLEX₁LLLX₂ LQMILNGINN YKNPKLTRML TX₃KFX₄MPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCX₅SIIS TLT (SEQ ID NO:33), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, отличную от His; где X₂ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Asp; где X₃ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe; где X₄ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Tug; и где X₅ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях X₁ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₂ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₃ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₄ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₅ представляет собой Ala. В некоторых случаях, X₁ представляет собой Ala, X₂ представляет собой Ala, X₃ представляет собой Ala, X₄ представляет собой Ala, а X₅ представляет собой Ala; и

APTSSSTKKT QLQLEX₁LLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TX₂KFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCX₃SIIS TLT (SEQ ID NO:34), где X₁ представляет собой любую аминокислоту, отличную от His; где X₂ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Phe; и где X₃ представляет собой любую аминокислоту, отличную от Gln. В некоторых случаях X₁ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₂ представляет собой Ala. В некоторых случаях X₃ представляет собой Ala. В некоторых

случаях, X_1 представляет собой Ala, X_2 представляет собой Ala, а X_3 представляет собой Ala.

Дополнительные полипептиды

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

Эпитопная метка

Подходящие эпитопные метки включают, но не ограничиваются ими, hemagglutinin (HA; например, YPYDVPDYA (SEQ ID NO:35); FLAG (например, DYKDDDDK (SEQ ID NO:36); с-мус (например, EQKLISEEDL; SEQ ID NO:37), и тому подобные.

Домен аффинности

Домены аффинности включают пептидные последовательности, которые могут взаимодействовать с партнером по связыванию, например, таким как иммобилизованный на твердой подложке, полезным для идентификации или очистки. Последовательности ДНК, кодирующие несколько последовательных отдельных аминокислот, таких как гистидин, при слиянии с экспрессированным белком, могут быть использованы для одностадийной очистки рекомбинантного белка путем связывания с высокой аффинностью с колонкой со смолой, такой как никел-сефароза. Типичные аффинные домены включают His5 (ННННН) (SEQ ID NO:38), HisX6 (НННННН) (SEQ ID NO:39), С-мус (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO:37), Flag (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:36), StrepTag (WSHPQFEK) (SEQ ID NO:40), hemagglutinin, например, HA Tag (YPYDVPDYA) (SEQ ID NO:35), глутатион-S-трансферазу (GST), тиоредоксинредуктазу, домен связывания целлюлозы, RYIRS (SEQ ID NO:41), Phe-His-His-Thr (SEQ ID NO:42), хитин-связывающий домен, S-пептид, пептид T7, домен SH2, C-концевая РНК-метка, WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO:43), связывающие металл домены, например, цинксвязывающие домены или кальцийсвязывающие домены, такие как домены из кальцийсвязывающих белков, например, кальмодулина, тропонина С, кальцийнейрина В, легкой цепи миозина, рековерина, S-модулина, визинина, VILIP, нейрокальцина, гиппокальцина, фрекенина, кальтрацина, большой субъединицы кальпаина, белков S100, парвальбумина, кальбиндина D9K, кальбиндина D28K и кальретинина, интеины, биотин, стрептавидин, MyoD, Id, последовательности лейциновой молнии и

мальтозосвязывающий белок.

Конъюгаты с лекарственным средством

Полипептидная цепь мультимерного полипептида по данному изобретению может содержать низкомолекулярное лекарственное средство, связанное (например, ковалентно присоединенное) с полипептидной цепью. Например, когда мультимерный полипептид по данному изобретению содержит полипептид Fc, полипептид Fc может содержать ковалентно связанное низкомолекулярное лекарственное средство. В некоторых случаях низкомолекулярное лекарственное средство представляет собой химиотерапевтический агент против рака, например цитотоксический агент. Полипептидная цепь мультимерного полипептида по данному изобретению может содержать цитотоксический агент, связанный (например, ковалентно связанный) с полипептидной цепью. Например, когда мультимерный полипептид по данному изобретению содержит полипептид Fc, полипептид Fc может содержать ковалентно связанный цитотоксический агент. Цитотоксические агенты включают пролекарства.

Лекарственное средство (например, химиотерапевтический противораковый агент) может быть связано прямо или косвенно с полипептидной цепью мультимерного полипептида по данному изобретению. Например, когда мультимерный полипептид по данному изобретению содержит полипептид Fc, лекарственное средство (например, химиотерапевтический противораковый агент) может быть связано прямо или косвенно с полипептидом Fc. Прямая связь может включать связь непосредственно с боковой цепью аминокислоты. Косвенная связь может быть связана через линкер. Лекарственное средство (например, химиотерапевтический противораковый агент) может быть связано с полипептидной цепью (например, полипептидом Fc) мультимерного полипептида по данному изобретению через тиоэфирную связь, амидную связь, карбаматную связь, дисульфидную связь или эфирную связь.

Линкеры включают расщепляемые линкеры и нерасщепляемые линкеры. В некоторых случаях линкер представляет собой расщепляемый протеазой линкер. Подходящие линкеры включают, например, пептиды (например, длиной от 2 до 10 аминокислот; например, длиной 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот), алкильные цепи, поли (этиленгликоль), дисульфидные группы, тиоэфирные группы, кислотолабильные группы, фотоллабильные группы, пептидазлабильные группы и эстеразные лабильные группы. Неограничивающими примерами подходящих линкеров являются: i) N-сукцинимидил-[(N-малеимидпропионамид)-тетраэтиленгликол]эстер (NHS-PEG4-малеимидин); ii) N-сукцинимидил4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB); N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)2-сульфбутаноат (сульф-SPDB); N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)

пентаноат (SPP); N-сукцинимидил-4-(N-малеимидметил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат) (LC-SMCC); κ-малеимидундеканодная кислота N-сукцинимидиловый эфир (KMUA); γ-малеимид-масляная кислота N-сукцинимидиловый эфир (GMBS); ε-малеимидокапроновая кислота N-гидроксисукцинимидный эфир (EMCS); m-малеимид бензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир (MBS); N-(α-малеимидацетокси)-сукцинимидный эфир (AMAS); сукцинимидил-6-(β-малеимидпропионамид)гексаноат (SMPH); N-сукцинимидил 4-(p-малеимидфенил)бутират (SMPB); N-(p-малеимидфенил)изоцианат (PMPI); N-сукцинимидил 4(2-пиридилтио)пентаноат (SPP); N-сукцинимидил(4-йод-ацетил)аминобензоат (SIAB); 6-малеимидкапроил (MC); малеимидпропаноил (MP); p-аминобензилоксткарбонил (PAB); N-сукцинимидил 4-(малеимидметил)циклогексанкарбоксилат (SMCC); N-сукцинимидил-4-(N-малеимидметил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амидкапроат), «длинноцепочечный» аналог SMCC (LC-SMCC); N-сукцинимидиловый эфир 3-малеимидпропановой кислоты (BMPS); N-сукцинимидил йодацетат (SIA); N-сукцинимидил бромацетат (SBA) и N-сукцинимидил 3-(бромацетомид)пропионат (SBAP).

Полипептид (например, полипептид Fc) может быть модифицирован сшивающими реагентами, такими как сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), сульфо-SMCC, малеимидбензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир (MBS), сульфо-MBS или сукцинимидил-йодацетат, как описано в литературе, для введения 1-10 реакционноспособных групп. Затем модифицированный полипептид Fc реагирует с тиолсодержащим цитотоксическим агентом с образованием конъюгата.

Например, когда мультимерный полипептид по данному изобретению содержит полипептид Fc, причем полипептидная цепь, содержащая полипептид Fc, может иметь формулу (A)-(L)-(C), где (A) представляет собой полипептидную цепь, содержащую полипептид Fc; где (L), если присутствует, является линкером; и где (C) представляет собой цитотоксический агент. (L), если присутствует, связывает (A) с (C). В некоторых случаях полипептидная цепь, содержащая полипептид Fc, может содержать более одного цитотоксического агента (например, 2, 3, 4 или 5 или более 5 цитотоксических агентов).

Подходящие лекарственные средства включают, например, рапамицин. Подходящие лекарственные средства включают, например, ретиноиды, такие как полностью транс-ретиноевая кислота (ATRA); витамин D3; аналог витамина D3; и тому подобное. Как отмечено выше, в некоторых случаях лекарственное средство представляет собой цитотоксический агент. Цитотоксические агенты известны в данной области техники. Подходящим цитотоксическим агентом может быть любое соединение, которое приводит к гибели клетки или вызывает гибель клетки, или каким-либо образом снижает

жизнеспособность клеток и включает, например, мейтанзиноиды и аналоги мейтанзиноидов, бензодиазепины, таксоиды, аналоги СС-1065 и СС -1065, дуокармицины и аналоги дуокармицина, энединины, таких как калихеамицины, аналоги доластатина и доластатина, в том числе ауристатины, производные томаймицина, производные лептомицина, метотрексат, цисплатин, карбоплатин, даунорубин, митохлоруксусный спирт, цуклофинсульфин, моринцилсульфин, моринфинцилоксин, моринфинцилоксин, молибуцин, рифинсульфин, цикоцилфосфин, моринцилсульфин, моринхолуксин, моринфинцил, альбумин, моринфуцин, хлоргин, хлоргин, рифин, хлоргин, рифин, хлоргинцин, молибуксин, циклоксин, хлоргинцин, альфа-хинсульфин доксорубин.

Например, в некоторых случаях цитотоксический агент представляет собой соединение, которое ингибирует образование микротрубочек в эукариотических клетках. Такие агенты включают, например, мейтансиноид, бензодиазепин, таксоид, СС-1065, дуокармицин, аналог дуокармицина, калихеамицин, доластатин, аналог доластатина, ауристин, томаймицин и лептомицин или пролекарство любого из вышеперечисленных. Мейтанзиноидные соединения включают, например, N(2')-деацетил-N(2')-(3-меркапто-1-оксопропил)-мейтанзин (DM1); N(2')-деацетил-N(2')-(4-меркапто-1-оксопентил)-мейтанзин (DM3) и N(2')-деацетил-N(2')-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-мейтанзин (DM4). Бензодиазепины включают, например, индолинобензодиазепины и оксазолидинобензодиазепины.

Цитотоксические агенты включают таксол; цитохалазин В; грамицидин D; этидиум бромид; эметин; митомин; этопосид; тенопосид; винкристин; винбластин; колхицин; доксорубин; даунорубин; дигидрокси антрацидин; мейтанзин или его аналог или производное; ауристин или функциональный пептидный аналог или его производное; доластатин 10 или 15, или его аналог; иринотекан или его аналог; митоксантрон; митрамицин; актиномицин D; 1-дегидротестостерон; глюкокортикоид; прокаин; тетракаин; лидокаин; пропранолол; пурамицин; калихеамицин или его аналог или производное; антимаболит; 6 меркаптопурин; 6 тиогуанин; цитарабин; флударабин; 5 фторурацил; декарбазин; гидроксимочевина; аспарагиназа; гемцитабин; кладрибин; алкилирующий агент; производное платины; дуокармицин А; дуокармицин SA; рахелмицин (СС-1065) или его аналог или производное; антибиотик; пиррол[2,1-с][1,4]-бензодиазепины (PDB); дифтерийный токсин; ризин-токсин; холерный токсин; Шигаподобный токсин; токсин LT; токсин С3; Шига токсин; токсин коклюша; столбнячный токсин; соевый ингибитор протеазы Боумана-Бирка; экзотоксин *Pseudomonas*; алорин; сапорин; модекцин; геланин; А-цепь абрина; А-цепь модекцина; альфа-сарцин; белки *Aleurites fordii*; белки диантина; белки *Phytolacca americana*;

ингибитор момордики харансткой; курцин; кротин; ингибиторы мыльнянки лекарственной; гелонин; митогеллин; рестриктоцин; феномицин; токсины эномицина; рибонуклеазы (РНказы); ДНКазы I; стафилококковый энтеротоксин А; противовирусный белок фитолакки; дифтерийный токсин и эндотоксин *Pseudomonas*.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ МУЛЬТИМЕРНОГО МОДУЛИРУЮЩЕГО Т-КЛЕТКИ ПОЛИПЕПТИДА

В данном изобретении предложен способ получения ТММР, содержащего один или более вариантов иммуномодулирующих полипептидов, которые проявляют уменьшенную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего родительского иммуномодулирующего полипептида дикого типа к ко-иммуномодулирующему полипептиду, включающий: А) создание библиотеки ТММР, содержащей множество элементов, причем каждый элемент содержит: а) первый полипептид, содержащий: i) эпитоп и ii) первый основной полипептид ГКГС, и б) второй полипептид, содержащий: i) второй полипептид ГКГС; и ii) необязательно полипептид Fc Ig или каркас не от Ig, причем каждый элемент содержит разный вариант иммуномодулирующего полипептида на первом полипептиде, втором полипептиде или как на первом, так и на втором полипептиде; В) определение аффинности каждого элемента библиотеки с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом; и С) выбор элемента, который проявляет пониженную аффинность с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом. В некоторых случаях, аффинность определяют с помощью биослойной интерферометрии (BLI) с использованием очищенных элементов библиотеки ТММР и когнатного ко-иммуномодулирующего полипептида. Методы BLI хорошо известны специалистам в данной области техники. Анализ BLI описан выше. См., например, Lad et al. (2015) *J. Biomol. Screen.* 20(4): 498-507 и Shah and Duncan (2014) *J. Vis. Exp.* 18:e51383.

В данном изобретении предложен способ получения ТММР, который проявляет селективное связывание с Т-клеткой, включающий: А) создание библиотеки ТММР, содержащей множество элементов, причем каждый элемент содержит: а) первый полипептид, содержащий: i) эпитоп; и ii) первый полипептид ГКГС; и б) второй полипептид, содержащий: i) второй полипептид ГКГС; и ii) необязательно полипептид Fc иммуноглобулина (Ig) или каркас не от Ig, причем каждый элемент включает другой вариант иммуномодулирующего полипептида на первом полипептиде, втором полипептиде, или как на первом, так и на втором полипептиде, при этом вариант иммуномодулирующего полипептида отличается по аминокислотной последовательности 1-10 аминокислотами от родительского иммуномодулирующего полипептида дикого типа;

В) приведение в контакт элемента библиотеки ТММР с Т-клеткой-мишенью, экспрессирующей на своей поверхности: i) когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывает родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа; и ii) Т-клеточный рецептор, который связывается с эпитопом, причем член библиотеки ТММР содержит метку эпитопа, так, что элемент библиотеки ТММР связывается с Т-клеткой-мишенью; С) приведение в контакт элемента библиотеки ТММР, связывающегося с Т-клеткой-мишенью с помощью флуоресцентно меченного связывающего агента, который связывается с меткой эпитопа, создание комплекса элемент библиотеки ТММР/Т-клетка-мишень/связывающий агент; D) измерение средней интенсивности флуоресценции (MFI) комплекса элемент библиотеки ТММР/Т-клетка-мишень/связывающий агент с использованием проточной цитометрии, при этом MFI, измеряемая в диапазоне концентраций элемента библиотеки ТММР, обеспечивает меру аффинность и очевидной avidности; и E) выбор элемента библиотеки ТММР, который выборочно связывает Т-клетку мишень, по сравнению со связыванием члена библиотеки ТММР с контрольной Т-клеткой, которая содержит: i) когнатный иммуномодулирующий полипептид, который связывает родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа; и ii) Т-клеточный рецептор, который связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, присутствующего в элементе библиотеки ТММР. В некоторых случаях элемент библиотеки ТММР, который идентифицирован как избирательно связывающийся с Т-клеткой-мишенью, выделяются из библиотеки.

В некоторых случаях родительские пары иммуномодулирующего полипептида дикого типа и когнатного иммуномодулирующего полипептида выбирают из:

IL-2 и рецептора IL-2;

4-1BBL и 4-1BB;

PD-L1 и PD-1;

CD70 и CD27;

TGF β и рецептора TGF β ;

CD80 и CD28;

CD86 и CD28;

Ox40L и Ox40;

FasL и Fas;

ICOS-L и ICOS;

ICAM и LFA-1;

JAG1 и Notch;

JAG1 и CD46;

CD80 и CTLA4; и

CD86 и CTLA4.

В данном изобретении предложен способ получения ТММР, содержащего один или более вариантов иммуномодулирующих полипептидов, которые проявляют пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего родительского иммуномодулирующего полипептида дикого типа к ко-иммуномодулирующему полипептиду, включающий отбор из библиотеки ТММР, включающей множество элементов, элемента, который проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, причем множество элементов содержит: а) первый полипептид, содержащий: i) эпитоп; и ii) первый полипептид ГКГС; и б) второй полипептид, содержащий: i) второй полипептид ГКГС; и ii) необязательно полипептид Fc Ig или каркас не от Ig, при этом элементы библиотеки содержат множество вариантов иммуномодулирующего полипептида, присутствующего в первом полипептиде, во втором полипептиде или как в первом, так и во втором полипептиде. В некоторых случаях этап отбора включает определение аффинности с использованием биослойной интерферометрии связывания между элементами библиотеки ТММР и когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом. В некоторых случаях ТММР является таким, как описанный выше.

В некоторых случаях способ дополнительно включает: а) приведение в контакт выбранного элемента библиотеки ТММР с Т-клеткой-мишенью, экспрессирующей на своей поверхности: i) когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывает родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа; и ii) Т-клеточный рецептор, который связывается с эпитопом, причем элемент библиотеки ТММР содержит метку эпитопа, так что элемент библиотеки ТММР связывается с Т-клеткой-мишенью; б) приведение в контакт выбранного элемента библиотеки ТММР с Т-клеткой-мишенью с флуоресцентно меченым связывающим агентом, который связывается с меткой эпитопа, создавая комплекс выбранный элемент библиотеки ТММР/Т-клетка-мишень/связывающий агент; и с) измерение средней интенсивности флуоресценции (MFI) комплекс выбранный элемент библиотеки ТММР/Т-клетка-мишень/связывающий агент с использованием проточной цитометрии, при этом MFI, измеренная в диапазоне концентраций выбранного элемента библиотеки ТММР, обеспечивает измерение аффинности и кажущейся avidности. Выбранный элемент библиотеки ТММР, который специфически связывается с Т-клеткой мишенью, по сравнению со связыванием элемента библиотеки ТММР с контрольной Т-клеткой мишенью, содержащей: i) когнатный иммуномодулирующий полипептид, который

связывает родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа; и ii) Т-клеточный рецептор, который связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, присутствующего в элементе библиотеки ТММР, идентифицируют как селективное связывание с Т-клеткой-мишенью. В некоторых случаях связывающий агент представляет собой антитело, специфичное к метке эпитопа. В некоторых случаях вариант иммуномодулирующего полипептида содержит от 1 до 20 аминокислотных замен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен) по сравнению с соответствующим родительским иммуномодулирующим полипептидом дикого типа. В некоторых случаях ТММР содержит два варианта иммуномодулирующих полипептидов. В некоторых случаях два варианта иммуномодулирующих полипептидов содержат одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых случаях первый полипептид содержит один из двух вариантов иммуномодулирующих полипептидов, и при этом второй полипептид содержит второй из двух вариантов иммуномодулирующих полипептидов. В некоторых случаях два варианта иммуномодулирующих полипептидов находятся в одной и той же полипептидной цепи ТММР. В некоторых случаях два варианта иммуномодулирующих полипептидов находятся в первой полипептидной цепи ТММР. В некоторых случаях два варианта иммуномодулирующих полипептидов находятся во второй полипептидной цепи ТММР.

В некоторых случаях способ дополнительно включает выделение выбранного элемента библиотеки ТММР из библиотеки. В некоторых случаях способ дополнительно включает обеспечение нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую выбранный элемент библиотеки ТММР. В некоторых случаях нуклеиновая кислота присутствует в рекомбинантном векторе экспрессии. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность функционально связана с элементом контроля транскрипции, который функционирует в эукариотической клетке. В некоторых случаях способ дополнительно включает введение нуклеиновой кислоты в эукариотическую клетку-хозяина и культивирование клетки в жидкой среде для синтеза кодированного выбранного элемента библиотеки ТММР в клетке. В некоторых случаях способ дополнительно включает выделение синтезированного выбранного элемента библиотеки ТММР из клетки или из жидкой культуральной среды, содержащей клетку. В некоторых случаях выбранный элемент библиотеки ТММР содержит полипептид Fc Ig. В некоторых случаях способ дополнительно включает конъюгирование лекарственного средства с полипептидом Fc Ig. В некоторых случаях, лекарственное средство представляет собой цитотоксический агент, выбранный из мейтансиноида, бензодиазепина, таксоида,

СС-1065, дуокармицина, аналога дуокармицина, калихеамицина, доластатина, аналога доластатина, ауристатины, томаймицина и лептомицина или пролекарства любого из вышеперечисленных. В некоторых случаях лекарственное средство представляет собой ретиноид. В некоторых случаях родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа и когнатные иммуномодулирующие полипептиды выбирают из: IL-2 и рецептора IL-2; 4-1BBL и 4-1BB; PD-L1 и PD-1; CD70 и CD27; TGF β и рецептора TGF β ; CD80 и CD28; CD86 и CD28; OX40L и OX40; FasL и Fas; ICOS-L и ICOS; ICAM и LFA-1; JAG1 и Notch; JAG1 и CD46; CD80 и CTLA4, и CD86 и CTLA4.

В данном изобретении предложен способ получения ТММР, содержащего один или более вариантов иммуномодулирующих полипептидов, которые проявляют сниженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего родительского иммуномодулирующего полипептида дикого типа к ко-иммуномодулирующему полипептиду, включающий: А) обеспечение библиотеки ТММР, содержащей множество элементов, причем множество элементов содержит: а) первый полипептид, содержащий: i) эпитоп и ii) первый основной полипептид ГКГС, и б) второй полипептид, содержащий: i) второй полипептид ГКГС; и ii) необязательно полипептид Fc Ig или каркас не от Ig, причем элементы библиотеки содержат разные варианты иммуномодулирующего полипептида, представленного в первом полипептиде, втором полипептиде или как на первом, так и на втором полипептиде; и В) выбор из библиотеки элемента, который проявляет пониженную аффинность с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом. В некоторых случаях этап отбора включает определение аффинности с использованием биослойной интерферометрии связывания между элементами библиотеки ТММР и когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом. В некоторых случаях ТММР является таким, как описанный выше.

В некоторых случаях способ дополнительно включает: а) приведение в контакт выбранного элемента библиотеки ТММР с Т-клеткой-мишенью, экспрессирующей на своей поверхности: i) когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывает родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа; и ii) Т-клеточный рецептор, который связывается с эпитопом, причем элемент библиотеки ТММР содержит метку эпитопа, так что элемент библиотеки ТММР связывается с Т-клеткой-мишенью; б) приведение в контакт выбранного элемента библиотеки ТММР с Т-клеткой-мишенью с флуоресцентно меченым связывающим агентом, который связывается с меткой эпитопа, создавая комплекс выбранный член библиотеки ТММР/Т-клетка-мишень/связывающий агент; и с) измерение средней интенсивности

флуоресценции (MFI) комплекс выбранный член библиотеки ТММР/Т-клетка-мишень/связывающий агент с использованием проточной цитометрии, при этом MFI, измеренная в диапазоне концентраций выбранного члена библиотеки ТММР, обеспечивает измерение аффинности и кажущейся avidности. Выбранный член библиотеки ТММР, который специфически связывается с Т-клеткой мишенью, по сравнению со связыванием члена библиотеки ТММР с контрольной Т-клеткой мишенью, содержащей: i) когнатный иммуномодулирующий полипептид, который связывает родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа; и ii) Т-клеточный рецептор, который связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, присутствующего в члене библиотеки ТММР, идентифицируют как селективное связывание с Т-клеткой-мишенью. В некоторых случаях связывающий агент представляет собой антитело, специфичное к метке эпитопа. В некоторых случаях вариант иммуномодулирующего полипептида содержит от 1 до 20 аминокислотных замен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен) по сравнению с соответствующим родительским иммуномодулирующим полипептидом дикого типа. В некоторых случаях ТММР содержит два варианта иммуномодулирующих полипептидов. В некоторых случаях два варианта иммуномодулирующих полипептидов содержат одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых случаях первый полипептид содержит один из двух вариантов иммуномодулирующих полипептидов, и при этом второй полипептид содержит второй из двух вариантов иммуномодулирующих полипептидов. В некоторых случаях два варианта иммуномодулирующих полипептидов находятся в одной и той же полипептидной цепи ТММР. В некоторых случаях два варианта иммуномодулирующих полипептидов находятся в первой полипептидной цепи ТММР. В некоторых случаях два варианта иммуномодулирующих полипептидов находятся во второй полипептидной цепи ТММР.

В некоторых случаях способ дополнительно включает выделение выбранного члена библиотеки ТММР из библиотеки. В некоторых случаях способ дополнительно включает обеспечение нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую выбранный член библиотеки ТММР. В некоторых случаях нуклеиновая кислота присутствует в рекомбинантном векторе экспрессии. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность функционально связана с элементом контроля транскрипции, который функционирует в эукариотической клетке. В некоторых случаях способ дополнительно включает введение нуклеиновой кислоты в эукариотическую клетку-хозяина и культивирование клетки в жидкой среде для синтеза кодированного выбранного члена библиотеки ТММР в клетке. В некоторых случаях

способ дополнительно включает выделение синтезированного выбранного члена библиотеки ТММР из клетки или из жидкой культуральной среды, содержащей клетку. В некоторых случаях выбранный член библиотеки ТММР содержит полипептид Fc Ig. В некоторых случаях способ дополнительно включает конъюгирование лекарственного средства с полипептидом Fc Ig. В некоторых случаях, лекарственное средство представляет собой цитотоксический агент, выбранный из мейтансиноида, бензодиазепина, таксоида, СС-1065, дуокармицина, аналога дуокармицина, калихеамицина, доластатина, аналога доластатина, ауристатины, томаймицина и лептомицина или пролекарства любого из вышеперечисленных. В некоторых случаях лекарственное средство представляет собой ретиноид. В некоторых случаях родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа и когнатные иммуномодулирующие полипептиды выбирают из IL-2 и рецептора IL-2; 4-1BBL и 4-1BB; PD-L1 и PD-1; TGF β и рецептора TGF β ; CD80 и CD28; CD86 и CD28; OX40L и OX40; FasL и Fas; ICOS-L и ICOS; CD70 и CD27; ICAM и LFA-1; JAG1 и Notch; JAG1 и CD46; CD80 и CTLA4, и CD86 и CTLA4.

Данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую ТММР по данному изобретению. Данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую ТММР по данному изобретению.

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

Отдельные нуклеиновые кислоты, кодирующие отдельные полипептидные цепи мультимерного полипептида

Данное изобретение относится к нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид по данному

изобретению. Как указано выше, в некоторых случаях отдельные полипептидные цепи мультимерного полипептида по данному изобретению кодируются отдельными нуклеиновыми кислотами. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, кодирующие отдельные полипептидные цепи мультимерного полипептида по данному изобретению, функционально связаны с элементами контроля транскрипции, например промоторами, такими как промоторы, которые функционируют в эукариотической клетке, причем промотор может быть конститутивным промотором или индуцибельным промотором.

Данное изобретение обеспечивает первую нуклеиновую кислоту и вторую нуклеиновую кислоту, причем первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, при этом первый полипептид содержит в направлении от N-конца до C-конца: а) эпитоп (например, Т-клеточный эпитоп); б) первый полипептид ГКГС; и с) иммуномодулирующий полипептид (например, вариант с пониженной аффинностью, как описано выше); и при этом вторая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, при этом второй полипептид содержит, в направлении от N-конца до C-конца: а) второй полипептид ГКГС; и б) полипептид Fc Ig. Подходящие Т-клеточные эпитопы, полипептиды ГКГС, иммуномодулирующие полипептиды и полипептиды Fc Ig описаны выше. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и второй полипептиды, функционально связаны с элементами контроля транскрипции. В некоторых случаях элемент контроля транскрипции представляет собой промотор, который функционирует в эукариотической клетке. В некоторых случаях нуклеиновые кислоты присутствуют в отдельных векторах экспрессии.

Данное изобретение обеспечивает первую нуклеиновую кислоту и вторую нуклеиновую кислоту, причем первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, при этом первый полипептид содержит в направлении от N-конца до C-конца: а) эпитоп (например, Т-клеточный эпитоп); б) первый полипептид ГКГС; и при этом вторая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, при этом второй полипептид содержит, в направлении от N-конца до C-конца: а) иммуномодулирующий полипептид (например, вариант с пониженной аффинностью, как описано выше); б) второй полипептид ГКГС; и с) полипептид Fc Ig. Подходящие Т-клеточные эпитопы, полипептиды ГКГС, иммуномодулирующие полипептиды и

полипептиды Fc Ig описаны выше. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и второй полипептиды, функционально связаны с элементами контроля транскрипции. В некоторых случаях элемент контроля транскрипции представляет собой промотор, который функционирует в эукариотической клетке. В некоторых случаях нуклеиновые кислоты присутствуют в отдельных векторах экспрессии.

Нуклеиновая кислота, кодирующая два или более полипептида, присутствующих в мультимерном полипептиде

Настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидные последовательности, кодирующие, по меньшей мере, первый полипептид и второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению. В некоторых случаях, когда мультимерный полипептид по данному изобретению содержит первый, второй и третий полипептид, нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый, второй и третий полипептиды. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, кодирующие первый полипептид и второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, включают протеолитически расщепляемый линкер, вставленный между нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый полипептид, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй полипептид. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, кодирующие первый полипептид и второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, включают внутренний участок посадки рибосомы (IRES), вставленный между нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый полипептид, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй полипептид. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, кодирующие первый полипептид и второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению, включают сигнал пропуска рибосомы (или *cis*-действующий гидролазный элемент, CHYSEL), вставленный между нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый полипептид, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй полипептид. Примеры нуклеиновых кислот описаны ниже, в которых протеолитически расщепляемый линкер предусмотрен между нуклеотидными последовательностями, кодирующими первый полипептид и второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению; в любом из этих вариантов осуществления вместо нуклеотидной последовательности, кодирующей протеолитически расщепляемый линкер, можно использовать IRES или сигнал пропуска рибосомы.

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

Данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный полипептид, причем рекомбинантный полипептид содержит, в направлении от N-конца до C-конца: а) эпитоп (например, Т-клеточный эпитоп); б) первый полипептид ГКГС; в) иммуномодулирующий полипептид (например, вариант с пониженной аффинностью, как описано выше); г) протеолитически расщепляемый линкер; е) второй полипептид ГКГС; и ф) полипептид Fc иммуноглобулина (Ig). Данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный полипептид, причем рекомбинантный полипептид содержит, в направлении от N-конца до C-конца: а) первый лидерный пептид; б) эпитоп; в) первый полипептид ГКГС; d) иммуномодулирующий полипептид (например, вариант с пониженной аффинностью, как описано выше); е) протеолитически расщепляемый линкер; е) второй лидерный пептид; г) второй полипептид ГКГС; и h) полипептид Fc Ig. Данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный полипептид, причем рекомбинантный полипептид содержит в направлении от N-конца до C-конца: а) эпитоп; б) первый полипептид ГКГС; в) протеолитически расщепляемый линкер; d) иммуномодулирующий полипептид (например, вариант с пониженной аффинностью, как описано выше); е) второй полипептид ГКГС; и ф) полипептид Fc Ig. В некоторых случаях первый лидерный пептид и второй лидерный пептид представляют собой лидерный пептид β 2-M. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность функционально связана с элементом контроля транскрипции. В некоторых случаях элемент контроля транскрипции представляет собой промотор, который функционирует в эукариотической клетке.

Подходящие полипептиды ГКГС описаны выше. В некоторых случаях первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид β 2-микроглобулина; и при этом второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I. В некоторых случаях полипептид β 2-микроглобулина содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью β 2М, изображенной на фиг. 4. В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I представляет собой тяжелую цепь HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-K или HLA-L. В некоторых случаях полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на любой из Фиг. 3А–3С. В некоторых случаях первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид альфа цепи ГКГС класса II; и при этом второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид бета цепи ГКГС класса II.

Подходящие полипептиды Fc описаны выше. В некоторых случаях полипептид Fc Ig представляет собой полипептид Fc IgG1, полипептид Fc IgG2, полипептид Fc IgG3, полипептид Fc IgG4, полипептид Fc IgA или полипептид Fc IgM. В некоторых случаях полипептид Fc Ig содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2А–2G.

Подходящие иммуномодулирующие полипептиды описаны выше.

Подходящие протеолитически расщепляемые линкеры описаны выше. В некоторых случаях протеолитически расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из: а) LEVLFQGP (SEQ ID NO:44); б) ENLYTQS (SEQ ID NO:45); в) DDDDK (SEQ ID NO:46); г) LVPR (SEQ ID NO:47) и е) GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:48).

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

Рекомбинантные векторы экспрессии

Данное изобретение предоставляет рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие нуклеиновые кислоты по данному изобретению. В некоторых случаях рекомбинантный вектор экспрессии является вектором, не происходящим из вируса. В некоторых случаях рекомбинантный вектор экспрессии представляет собой вирусную конструкцию, например рекомбинантную аденоассоциированную вирусную конструкцию (см., например, патент США № 7078387), рекомбинантную аденовирусную конструкцию, рекомбинантную лентивирусную конструкцию, рекомбинантную ретровирусную конструкцию, неинтегрирующий вирусный вектор и др.

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

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

В зависимости от используемой системы хозяин/вектор, любой из подходящих элементов управления транскрипцией и трансляцией, включая конститутивные и индуцибельные промоторы, элементы энхансера транскрипции, терминаторы транскрипции и т.д., могут использоваться в векторе экспрессии (см., например, Bitter et

al., (1987) *Methods in Enzymology*, 153:516-544).

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

Неограничивающие примеры подходящих эукариотических промоторов (промоторы, функционирующие в эукариотической клетке) включают промоторы цитомегаловируса (CMV) с крайне ранней стадии, тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSV), ранние и поздние SV40, длинные концевые повторы (LTR) ретровируса и мышинный металлотионеин-I. Выбор подходящего вектора и промотора находится в пределах обычного уровня знаний в данной области техники. Вектор экспрессии также может содержать сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и терминатор транскрипции. Вектор экспрессии также может содержать соответствующие последовательности для усиления экспрессии.

ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ-ХОЗЯЕВА

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

Подходящие клетки-хозяева включают эукариотические клетки, такие как клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки млекопитающих. В некоторых случаях клетка-хозяин является клеткой линии клеток млекопитающих. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают клеточные линии человека, клеточные линии приматов, отличных от человека, клеточные линии грызунов (например, мышей, крыс) и тому подобное. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, клетки HeLa (например, № CCL-2 Американской коллекции типовых культур (ATCC)), клетки CHO (например, ATCC № CRL9618, CCL61, CRL9096), клетки 293 (например, ATCC № CRL-1573), клетки Vero, клетки NIH 3T3 (например,

ATCC № CRL-1658), клетки Huh-7, клетки ВНК(например, ATCC № CCL10), клетки PC12 (ATCC № CRL1721), клетки COS, клетки COS-7 (ATCC № CRL1651), клетки RAT1, клетки L мыши (ATCC № CCL1.3), клетки эмбриональной почки человека (НЕК) (ATCC № CRL1573), клетки HLНерG2, и тому подобное.

В некоторых случаях клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, которая была генетически модифицирована таким образом, что она не синтезирует эндогенный МНС β 2-М.

В некоторых случаях клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, которая была генетически модифицирована таким образом, что она не синтезирует эндогенную тяжелую цепь ГКГС класса I.

КОМПОЗИЦИИ

Данное изобретение относится к композициям, включая фармацевтические композиции, содержащие ТММР (synTac) по данному изобретению. Данное изобретение относится к композициям, включая фармацевтические композиции, содержащие мультимерный полипептид по данному изобретению. Данное изобретение относится к композициям, включая фармацевтические композиции, содержащие нуклеиновую кислоту или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению.

Композиции, содержащие мультимерный полипептид

Композиция по данному изобретению может содержать, помимо мультимерного полипептида по данному изобретению, один или более из следующих компонентов: соль, например, NaCl, MgCl₂, KCl, MgSO₄, и т.д.; буферный агент, например, Трис-буфер, N-(2-гидроксиэтил) пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота) (HEPES), 2-(N-морфолино) этансульфоновая кислота (MES), натриевая соль 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES), 3-(N-морфолино) пропансульфоновая кислота (MOPS), N-трис[гидроксиметил]метил-3-аминопропансульфоновая кислота (TAPS), и т.п.; солюбилизующий агент; детергент, например, неионный детергент, такой как Tween-20, и т.д.; ингибитор протеазы; глицерин; и тому подобное.

Композиция может содержать фармацевтически приемлемый эксципиент, разнообразие которого известно в данной области техники и не нуждается в подробном обсуждении в данном документе. Фармацевтически приемлемые эксципиенты подробно описаны в различных публикациях, включая, например, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 19th Ed. (1995), или последнее издание, Mack Publishing Co; A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel et al., eds 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; and Handbook of Pharmaceutical

Excipients (2000) A.H. Kibbe et al., eds., 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

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

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

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

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

Другие примеры составов, подходящих для парентерального введения, включают

изотонические стерильные инъекционные растворы, антиоксиданты, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Например, рассматриваемая фармацевтическая композиция может присутствовать в контейнере, например стерильном контейнере, таком как шприц. Композиции могут быть представлены в герметичных контейнерах с единичными или многократными дозами, таких как ампулы и флаконы, и могут храниться в замороженных (лиофилизированных) условиях, требующих только добавления стерильного жидкого эксципиента, например воды, для инъекций, непосредственно перед использованием. Инъекционные растворы и суспензии для немедленного введения могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

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

Данное изобретение обеспечивает контейнер, содержащий композицию по данному изобретению, например жидкую композицию. Контейнер может представлять собой, например, шприц, ампулу и тому подобное. В некоторых случаях контейнер является стерильным. В некоторых случаях как контейнер, так и композиция являются стерильными.

Данное изобретение относится к композициям, включая фармацевтические композиции, содержащие ТММР по данному изобретению. Композиция может содержать: а) ТММР по данному изобретению; и б) эксципиент, как описано выше для мультимерных полипептидов. В некоторых случаях эксципиент представляет собой фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых случаях Т-клеточный мультимерный полипептид по данному изобретению присутствует в жидкой композиции. Таким образом, данное изобретение относится к композициям (например, жидким композициям, включая фармацевтические композиции), содержащие Т-клеточный мультимерный полипептид по данному изобретению. В некоторых случаях композиция по данному изобретению содержит: а) Т-клеточный мультимерный полипептид по данному изобретению; и б) физиологический раствор (например, 0,9% NaCl). В некоторых случаях композиция является стерильной. В некоторых случаях композиция является подходящей для введения субъекту-человеку,

например, когда композиция является стерильной и не содержит обнаруживаемых пирогенов и/или других токсинов. Таким образом, данное изобретение относится к композиции, содержащей: а) Т-клеточный мультимерный полипептид по данному изобретению; и б) физиологический раствор (например, 0,9% NaCl), причем композиция является стерильной и не содержит детектируемых пирогенов и/или других токсинов.

Композиции, содержащие нуклеиновую кислоту или рекомбинантный вектор экспрессии

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

Композиция по данному изобретению может содержать: а) одну или более нуклеиновых кислот или один или более рекомбинантных векторов экспрессии, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие ТММР; и б) один или более из: буфера, поверхностно-активного вещества, антиоксиданта, гидрофильного полимера, декстрина, хелатирующего агента, суспендирующего агента, солюбилизатора, загустителя, стабилизатора, бактериостатического агента, смачивающего агента, и консерванта. Подходящие буферы включают без ограничения, (такие как N,N-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновая кислота (BES), бис(2-гидроксиэтил)амино-трис(гидроксиметил)метан (BIS-Tris), N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'3-пропансульфоновая кислота (EPPS или HEPPS), глицилглицин, N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (HEPES), 3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота (MOPS), пиперазин-N,N'-бис(2-этан-сульфоновая кислота) (PIPES), бикарбонат натрия, 3-(N-трис(гидроксиметил)-метил-амино-)-2-гидрокси-пропансульфоновая кислота) TAPSO, (N-трис(гидроксиметил)метил-2-аминоэтансульфоновая кислота (TES), N-трис(гидроксиметил)метил-глицин (Tricine), трис(гидроксиметил)-аминометан (Tris), и т.д.). Подходящие соли включают, например, NaCl, MgCl₂, KCl, MgSO₄, и т.д.

Фармацевтический состав по данному изобретению может включать нуклеиновую

кислоту или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению в количестве от около 0,001% до около 90% (мас./мас.). В описании составов ниже «рассматриваемая нуклеиновая кислота или рекомбинантный вектор экспрессии» следует понимать как включающий нуклеиновую кислоту или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению. Например, в некоторых случаях состав по данному изобретению содержит нуклеиновую кислоту или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению.

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

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

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

Липосомы также включают «стерически стабилизированные» липосомы, термин,

который при использовании в данном документе относится к липосомам, содержащим один или более специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению продолжительности циркуляции по сравнению с липосомами, в которых отсутствуют такие специализированные липиды. Примерами стерически стабилизированных липосом являются те, в которых часть образующей пузырьки липидной части липосомы содержит один или более гликолипидов или дериватизирована одним или более гидрофильными полимерами, такими как фрагмент полиэтиленгликоля (ПЭГ). Липосомы и их применение дополнительно описаны в патенте США № 6287860, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Составы и композиции по данному раскрытию могут также включать поверхностно-активные вещества. Использование поверхностно-активных веществ в лекарственных продуктах, составах и эмульсиях хорошо известно в данной области техники. Поверхностно активные вещества и их применение дополнительно описаны в патенте США № 6287860.

В одном варианте осуществления включены различные усилители проникновения для эффективной доставки нуклеиновых кислот. В дополнение к содействию диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны усилители проникновения также увеличивают проницаемость липофильных лекарственных средств. Усилители проникновения могут быть классифицированы как принадлежащие к одной из пяти широких категорий, то есть поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, желчные соли, хелатообразующие агенты и нехелатообразующие несурфактанты. Усилители проникновения и их применение дополнительно описаны в патенте США № 6287860, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, гелевые капсулы, саше, таблетки или минитаблетки. Загустители, ароматизаторы, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие добавки или связующие вещества могут быть желательны. Подходящие пероральные препараты включают препараты, в которых указанную антисмысловую нуклеиновую кислоту вводят в сочетании с одним или более усилителями проникновения, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются ими, жирные кислоты и/или сложные эфиры или их соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли и жирные кислоты и их применение дополнительно описаны в патенте США № 6287860. Также подходящими являются комбинации усилителей проникновения, например, жирных кислот/солей в

сочетании с желчными кислотами/солями. Примером подходящей комбинации является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA (урсодеоксихолиевая кислота). Другие усилители проникновения включают, но не ограничиваются ими, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. Подходящие усилители проникновения также включают пропиленгликоль, диметилсульфоксид, триэтаноамин, N, N-диметилацетамид, N, N-диметилформамид, 2-пирролидон и его производные, тетрагидрофуруриловый спирт и AZONE™.

Данное изобретение обеспечивает способ селективной модуляции активности эпитоп-специфической Т-клетки, включающий приведение в контакт Т-клетки с мультимерным полипептидом по данному изобретению, причем контакт Т-клетки с мультимерным полипептидом по данному изобретению селективно модулирует активность эпитоп-специфической Т-клетки. В некоторых случаях приведение в контакт происходит *in vitro*. В некоторых случаях приведение в контакт происходит *in vivo*. В некоторых случаях приведение в контакт происходит *ex vivo*.

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

Когда мультимерный полипептид по данному изобретению содержит иммуномодулирующий полипептид, который является активирующим полипептидом, контакт Т-клетки с мультимерным полипептидом активирует эпитоп-специфическую Т-клетку. В некоторых случаях эпитоп-специфическая Т-клетка представляет собой Т-клетку, которая специфична для эпитопа, присутствующего на раковой клетке, и контакт эпитоп-специфической Т-клетки с мультимерным полипептидом увеличивает цитотоксическую активность Т-клетки по отношению к раковой клетке. В некоторых случаях эпитоп-специфическая Т-клетка представляет собой Т-клетку, которая специфична для эпитопа, присутствующего на раковой клетке, и контакт эпитоп-специфической Т-клетки с мультимерным полипептидом увеличивает количество эпитоп-специфических Т-клеток

В некоторых случаях эпитоп-специфическая Т-клетка представляет собой Т-клетку, которая специфична для эпитопа, присутствующего на клетке, зараженной вирусом, и контакт эпитоп-специфической Т-клетки с мультимерным полипептидом увеличивает цитотоксическую активность Т-клетки по отношению к клетке, зараженной

вирусом. В некоторых случаях эпитоп-специфическая Т-клетка представляет собой Т-клетку, которая специфична для эпитопа, присутствующего на клетке, зараженной вирусом, и контакт эпитоп-специфической Т-клетки с мультимерным полипептидом увеличивает количество эпитоп-специфических Т-клеток

Когда мультимерный полипептид по данному изобретению содержит иммуномодулирующий полипептид, который является ингибирующим полипептидом, контакт Т-клетки с мультимерным полипептидом ингибирует эпитоп-специфическую Т-клетку. В некоторых случаях эпитоп-специфическая Т-клетка представляет собой самореактивную Т-клетку, которая специфична для эпитопа, присутствующего в аутоантигене, и приведение в контакт уменьшает количество самореактивных Т-клеток.

Данное изобретение обеспечивает способ лечения индивидуума, включающий введение индивидууму количества ТММР по данному изобретению или одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих ТММР, эффективных для лечения индивидуума. Также предоставлен ТММР по данному изобретению для применения в способе лечения организма человека или животного. В некоторых случаях способ лечения по данному изобретению включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, одного или более рекомбинантных экспрессирующих векторов, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид по данному изобретению. В некоторых случаях способ лечения по данному изобретению включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, одной или более молекул мРНК, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие ТММР по данному изобретению. В некоторых случаях способ лечения по данному изобретению включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, ТММР по данному изобретению. Состояния, которые можно лечить, включают, например, рак и аутоиммунные расстройства, как описано ниже.

В некоторых случаях ТММР по данному изобретению, при введении индивидууму, нуждающемуся в этом, индуцирует как эпитоп-специфический Т-клеточный ответ, так и эпитоп-неспецифический Т-клеточный ответ. Другими словами, в некоторых случаях ТММР по данному изобретению, при введении индивидууму, нуждающемуся в этом, индуцирует эпитоп-специфический ответ Т-клеток, модулируя активность первой Т-клетки, которая содержит на поверхности как : i) TCR, специфичный для эпитопа, присутствующего в ТММР; так и ii) ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывается с иммуномодулирующим полипептидом, присутствующим в ТММР; и индуцирует эпитоп-неспецифический ответ Т-клеток путем модулирования активности второй Т-клетки, которая содержит на поверхности: i) TCR, специфичный для эпитопа,

присутствующего в ТММР; и ii) ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывается с иммуномодулирующим полипептидом, присутствующим в ТММР. Отношение эпитоп-специфического Т-клеточного ответа к эпитоп-неспецифическому Т-клеточному ответу составляет по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 50:1 или по меньшей мере 100:1. Отношение эпитоп-специфического Т-клеточного ответа к эпитоп-неспецифическому Т-клеточному ответу составляет от около 2:1 до около 5:1, от около 5:1 до около 10:1, от около 10:1 до около 15:1, от около 15:1 до около 20:1, от около 20:1 до около 25:1, от около 25:1 до около 50:1, или от около 50:1 до около 100:1 или более чем 100:1. «Модулирование активности» Т-клетки может включать одно или более из: i) активирование цитотоксической Т-клетки (например, CD8⁺); ii) индукцию цитотоксической активности цитотоксической Т-клетки (например, CD8⁺); iii) индукцию продуцирования и высвобождения цитотоксина (например, перфорина; гранзима; гранулезина) цитотоксической Т-клеткой (например, CD8⁺) iv) ингибирование активности аутореактивной Т-клетки; и тому подобное.

Сочетание пониженной аффинности иммуномодулирующего полипептида с его когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом, и аффинность эпитопа с TCR, обеспечивает улучшенную селективность ТММР по данному изобретению. Таким образом, например, ТММР по данному изобретению связывается с повышенной авидностью с первой Т-клеткой, которая содержит на поверхности как: i) TCR, специфичный для эпитопа, присутствующего в ТММР, так и ii) ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывается с иммуномодулирующим полипептидом, присутствующим в ТММР, по сравнению с авидностью с которой он связывается со второй Т-клеткой, которая содержит на поверхности: i) TCR, специфичный для эпитопа, отличного от эпитопа, присутствующего в ТММР, и ii) ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывается с иммуномодулирующим полипептидом, присутствующим в ТММР.

Настоящее изобретение относится к способу селективной модуляции активности эпитоп-специфической Т-клетки у индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества мультимерного полипептида по данному изобретению или одной или более нуклеиновых кислот (например, векторов экспрессии; мРНК и т.д.), содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид, причем мультимерный полипептид избирательно модулирует активность эпитоп-специфической Т-клетки у индивидуума. Избирательно модулирующая активность эпитоп-специфической Т-клетки может лечить заболевание или расстройство у

индивидуума. Таким образом, данное изобретение обеспечивает способ лечения, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества мультимерного полипептида по данному изобретению.

В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид является активирующим полипептидом, а мультимерный полипептид активирует эпитоп-специфическую Т-клетку. В некоторых случаях эпитоп представляет собой эпитоп, ассоциированный с раком, и мультимерный полипептид увеличивает активность Т-клетки, специфичной для эпитопа, ассоциированного с раком.

Данное изобретение обеспечивает способ лечения рака у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму эффективного количества мультимерного полипептида по данному изобретению или одной или более нуклеиновых кислот (например, векторов экспрессии; мРНК и т.д.), содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид, причем мультимерный полипептид содержит Т-клеточный эпитоп, который является эпитопом рака, и при этом мультимерный полипептид содержит стимулирующий иммуномодулирующий полипептид. В некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает количество раковых клеток у индивидуума. Например, в некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает количество раковых клеток у индивидуума на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% по сравнению с количеством раковых клеток у индивидуума перед введением мультимерного полипептида или при отсутствии введения мультимерного полипептида. В некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает количество раковых клеток у индивидуума до неопределяемых уровней.

В некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает массу опухоли у индивидуума. Например, в некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного

полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму (индивидууму, имеющему опухоль) уменьшает массу опухоли у индивидуума на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% по сравнению с массой опухоли у индивидуума перед введением мультимерного полипептида или при отсутствии введения мультимерного полипептида. В некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму (индивидууму, имеющему опухоль) уменьшает объем опухоли у индивидуума. Например, в некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму (индивидууму, имеющему опухоль) уменьшает объем опухоли у индивидуума на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% по сравнению с объемом опухоли у индивидуума перед введением мультимерного полипептида или при отсутствии введения мультимерного полипептида. В некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму увеличивает время выживания у индивидуума. Например, в некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму увеличивает время выживания индивидуума на по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, от 3 месяцев до 6 месяцев, от 6 месяцев до 1 года, от 1 года до 2 лет, от 2 лет до 5 лет, от 5 лет до 10 лет или более 10 лет, по сравнению с ожидаемым временем выживания индивидуума при отсутствии введения мультимерного полипептида.

В некоторых случаях эпитоп-специфическая Т-клетка представляет собой Т-клетку, которая специфична для эпитопа, присутствующего на клетке, зараженной вирусом, и контакт эпитоп-специфической Т-клетки с мультимерным полипептидом увеличивает цитотоксическую активность Т-клетки по отношению к клетке, зараженной

вирусом. В некоторых случаях эпитоп-специфическая Т-клетка представляет собой Т-клетку, которая специфична для эпитопа, присутствующего на клетке, зараженной вирусом, и контакт эпитоп-специфической Т-клетки с мультимерным полипептидом увеличивает количество эпитоп-специфических Т-клеток.

Таким образом, данное изобретение обеспечивает способ лечения вирусной инфекции у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму эффективного количества мультимерного полипептида по данному изобретению или одной или более нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид, причем мультимерный полипептид содержит Т-клеточный эпитоп, который является эпитопом вируса, и при этом мультимерный полипептид содержит стимулирующий иммуномодулирующий полипептид. В некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает количество пораженных вирусом клеток у индивидуума. Например, в некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает количество пораженных вирусом клеток у индивидуума на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% по сравнению с количеством пораженных вирусом клеток у индивидуума перед введением мультимерного полипептида или при отсутствии введения мультимерного полипептида. В некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает количество пораженных вирусом клеток у индивидуума до неопределяемых уровней.

Таким образом, данное изобретение обеспечивает способ лечения инфекции у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму эффективного количества ТММР по данному изобретению или одной или более нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид, причем мультимерный полипептид содержит Т-клеточный эпитоп, который является патоген-ассоциированным эпитопом, и при этом мультимерный полипептид содержит стимулирующий иммуномодулирующий полипептид. В некоторых случаях «эффективное количество» ТММР по данному изобретению представляет собой количество, которое при

введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает количество патогенов у индивидуума. Например, в некоторых случаях «эффективное количество» ТММР по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает количество патогенов у индивидуума на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% по сравнению с количеством патогенов у индивидуума перед введением мультимерного полипептида или при отсутствии введения мультимерного полипептида. В некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает количество патогенов у индивидуума до неопределяемых уровней. Патогены включают вирусы, бактерии, простейшие и тому подобное.

В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид является ингибирующим полипептидом, а мультимерный полипептид ингибирует активность эпитоп-специфической Т-клетки. В некоторых случаях эпитоп является самоэпитопом, а мультимерный полипептид избирательно ингибирует активность Т-клеток, специфичных для этого эпитопа.

Данное изобретение обеспечивает способ лечения аутоиммунного нарушения у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму эффективного количества мультимерного полипептида по данному изобретению или одной или более нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие мультимерный полипептид, причем мультимерный полипептид содержит Т-клеточный эпитоп, который является самоэпитопом, и при этом мультимерный полипептид содержит ингибирующий иммуномодулирующий полипептид. В некоторых случаях «эффективное количество» ТММР по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает количество самореактивных Т-клеток у индивидуума на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% по сравнению с количеством самореактивных Т-клеток у индивидуума перед введением мультимерного полипептида или при отсутствии введения ТММР. В некоторых случаях «эффективное количество» мультимерного полипептида представляет собой количество, которое при введении в

одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму уменьшает продуцирование цитокинов Th2 у индивидуума. В некоторых случаях «эффективное количество» ТММР по данному изобретению представляет собой количество, которое при введении в одной или более дозах нуждающемуся в этом индивидууму облегчает один или более симптомов, связанных с аутоиммунным заболеванием у индивидуума.

Как отмечено выше, в некоторых случаях при осуществлении способа лечения субъекта ТММР по данному изобретению вводят нуждающемуся в этом индивидууму в качестве мультимерного полипептида. *per se*. В других случаях при осуществлении способа лечения субъекта одну или более нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие ТММР по данному изобретению, вводят индивидууму, нуждающемуся в этом. Таким образом, в других случаях одну или более нуклеиновых кислот по данному изобретению, например один или несколько рекомбинантных векторов экспрессии по данному изобретению, вводят индивидууму, нуждающемуся в этом.

Составы

Подходящие составы описаны выше, причем подходящие составы включают фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых случаях подходящая композиция содержит: а) модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по данному изобретению; и б) фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых случаях подходящая композиция содержит: а) нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую мультимерный полипептид по данному изобретению; и б) фармацевтически приемлемый эксципиент; в некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых случаях подходящая композиция содержит: а) первую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид ТММР по данному изобретению; б) вторую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй полипептид мультимерного полипептида по данному изобретению; и с) фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых случаях подходящая композиция содержит: а) нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую мультимерный полипептид ТММР по данному изобретению; и б) фармацевтически приемлемый эксципиент; в некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых случаях подходящая композиция содержит: а) первый рекомбинантный векторы экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую первый полипептид ТММР по данному изобретению; б) второй рекомбинантный векторы экспрессии, содержащий нуклеотидную

последовательность, кодирующую второй полипептид ТММР по данному изобретению; и с) фармацевтически приемлемый эксципиент.

Подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты описаны выше.

Дозы

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

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

до 100 мг на кг массы тела, от 100 мкг до 10 мг на кг массы тела или от 100 мкг до 1 мг на кг массы тела.

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

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

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

Пути введения

Активный агент (мультимерный полипептид по данному изобретению,

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

Обычные и фармацевтически приемлемые пути введения включают внутриопухолевое, перитуморальное, внутримышечное, внутрелимфатическое, внутритрахеальное, внутрочерепное, подкожное, внутрикожное, местное применение, внутривенное, внутриартериальное, ректальное, назальное, оральное и другие энтеральные и парентеральные пути введения. Пути введения могут быть объединены, если желательно, или скорректированы в зависимости от мультимерного полипептида и/или желаемого эффекта. Мультимерный полипептид по данному изобретению или нуклеиновую кислоту или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению можно вводить в однократной или многократных дозах.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят внутривенно. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят внутримышечно. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят интралимфатически. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению применяют местно. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят через опухоль. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят внутрь опухоли. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят внутрь черепа. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновую кислоту по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению вводят подкожно.

В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению вводят внутривенно. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению

вводят внутримышечно. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению применяют местно. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению вводят через опухоль. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению вводят внутрь опухоли. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению вводят внутрь черепа. В некоторых случаях мультимерный полипептид вводят подкожно. В некоторых случаях мультимерный полипептид по данному изобретению вводят интралимфатически.

Мультимерный полипептид по данному изобретению, нуклеиновая кислота по данному изобретению или рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению могут быть введены хозяину с использованием любых доступных общепринятых способов и путей, подходящих для доставки обычных лекарственных средств, включая системные или местные пути. В общем, способы введения, предполагаемые для применения в способе по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, энтеральный, парентеральный и ингаляционный пути.

Парентеральные пути введения, отличные от ингаляционного введения, включают, но не ограничиваются ими, местный, трансдермальный, подкожный, внутримышечный, внутриорбитальный, внутрикапсулярный, внутриспинальный, внутрисстенный, внутриопухольевый, внутрилимфатический, перитуморальный и внутривенный пути, *т.е.*, любой путь введения, кроме как через пищеварительный канал. Парентеральное введение может быть осуществлено для осуществления системной или местной доставки мультимерного полипептида по данному изобретению, нуклеиновой кислоты по данному изобретению или рекомбинантного вектора экспрессии по данному изобретению. Там, где желательна системная доставка, введение обычно включает инвазивное или системно абсорбированное местное или слизистое введение фармацевтических препаратов.

Подходящие для лечения субъекты

Субъекты, подходящие для лечения способом по данному изобретению, включают индивидуумов, у которых присутствует рак, включая индивидуумов, у которых был диагностирован рак, индивидуумов, которых лечили от рака, но которые не смогли ответить на лечение, и индивидуумов, которых лечили от рака и который первоначально ответил, но впоследствии стал невосприимчивым к лечению. Субъекты, подходящие для лечения способом по настоящему изобретению, включают индивидуумов, у которых есть инфекция (например, инфекция патогеном, таким как бактерия, вирус, простейший и т. д.), включая индивидуумов, у которых была диагностирована инфекция и индивидуумов, которые прошли лечение от инфекции, но не смогли ответить на лечение. Субъекты, подходящие для лечения способом по данному изобретению, включают индивидуумов, у

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

Примеры неограничивающих аспектов изобретения

Аспекты, включая варианты осуществления, данного изобретения, описанного выше, могут быть полезны отдельно или в комбинации с одним или более другими аспектами или вариантами осуществления. Не ограничивая вышеприведенное описание, некоторые неограничивающие аспекты изобретения, пронумерованные 1-134, представлены ниже. Как будет понятно специалистам в данной области техники после прочтения данного описания, каждый из отдельно пронумерованных аспектов может использоваться или комбинироваться с любым из предшествующих или следующих отдельно пронумерованных аспектов. Это предназначено для обеспечения поддержки всех таких комбинаций аспектов и не ограничивается комбинациями аспектов, явно предоставленными ниже:

Аспект 1. Модулирующие Т-клетки мультимерные полипептиды, причем мультимерный полипептид представляет собой:

А) гетеродимер, содержащий: а) первый полипептид, содержащий первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС); и б) второй полипептид, содержащий второй полипептид ГКГС, причем первый полипептид или второй полипептид содержит эпитоп; при этом первый полипептид и/или второй полипептид содержат один или более иммуномодулирующих полипептидов, которые могут быть одинаковыми или различными, и при этом по меньшей мере один из одного или более иммуномодулирующих полипептидов могут представлять собой иммуномодулирующий полипептид дикого типа или вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа, при этом вариант иммуномодулирующего полипептида содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью иммуномодулирующего

полипептида дикого типа; и при этом первый полипептид или второй полипептид необязательно содержит полипептид Fc иммуноглобулина (Ig) или каркас не от Ig; или

В) гетеродимер, содержащий: а) первый полипептид, содержащий первый полипептид ГКГС; и б) второй полипептид, содержащий второй полипептид ГКГС, при этом первый полипептид или второй полипептид содержит эпитоп; при этом первый полипептид и/или второй полипептид содержит один или более иммуномодулирующих полипептидов, которые могут быть одинаковыми или различными,

при этом по меньшей мере один из одного или более иммуномодулирующих полипептидов представляют собой вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа, при этом вариант иммуномодулирующего полипептида содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью иммуномодулирующего полипептида дикого типа,

при этом, по меньшей мере один из одного или более иммуномодулирующих доменов представляет собой вариант иммуномодулирующего полипептида, который проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа для когнатного ко-иммуномодулирующего полипептида, и при этом эпитоп связывается с рецептором Т-клеток (TCR) на Т-клетке с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} М так, что: i) модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая на по меньшей мере 25% больше, чем аффинность с которой модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид связывает вторую Т-клетку, при этом первая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид и TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} М, и при этом вторая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, но не экспрессирует на своей поверхности TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} М; и/или ii) отношение аффинность связывания контрольного модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, причем контрольный содержит иммуномодулирующий полипептид дикого типа, к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду с аффинностью связывания модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, содержащего вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, которую измеряют с помощью биослойной интерферометрии, находится в диапазоне от 1,5:1 до 10^6 :1; и при этом вариант иммуномодулирующего полипептида содержит 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью иммуномодулирующего полипептида дикого типа; и

при этом первый полипептид или второй полипептид необязательно содержит полипептид Fc Ig или каркас не от Ig; или

С) гетеродимер, содержащий: а) первый полипептид, содержащий, в направлении от N-конца к С-концу: i) эпитоп; ii) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) и б) второй полипептид, содержащий, в направлении от N-конца к С-концу: i) второй полипептид ГКГС, и ii) необязательно полипептид Fc иммуноглобулина (Ig) или каркас не от Ig, причем мультимерный полипептид содержит один или более иммуномодулирующих доменов, которые могут быть одинаковыми или различными, при этом, по меньшей мере, один из одного или более иммуномодулирующих доменов расположен: А) на С-конце первого полипептида; В) на N-конце второго полипептида; С) на С-конце второго полипептида или D) на С-конце первого полипептида и на N-конце второго полипептида, и при этом по меньшей мере, один из одного или более иммуномодулирующих доменов может представлять собой иммуномодулирующий полипептид дикого типа или вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа, при этом вариант иммуномодулирующего полипептида содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замены по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа; и

необязательно, при этом, по меньшей мере один из одного или более иммуномодулирующих доменов представляет собой вариант иммуномодулирующего полипептида, который проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа для когнатного ко-иммуномодулирующего полипептида, и при этом эпитоп связывается с рецептором Т-клеток (TCR) на Т-клетке с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} М так, что: i) модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая на по меньшей мере 25% больше, чем аффинность с которой модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид связывает вторую Т-клетку, при этом первая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид и TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} М, и при этом вторая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, но не экспрессирует на

своей поверхности TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} М; и/или ii) отношение аффинность связывания контрольного модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, причем контрольный содержит иммуномодулирующий полипептид дикого типа, к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду с аффинностью связывания модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, содержащего вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, которую измеряют с помощью биослойной интерферометрии, находится в диапазоне от 1,5:1 до 10^6 :1; и при этом вариант иммуномодулирующего полипептида содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью иммуномодулирующего полипептида дикого типа.

Аспект 2. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 1, отличающийся тем, что модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая по меньшей мере на 50% выше, чем аффинность, с которой он связывает вторую Т-клетку.

Аспект 3. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 1, отличающийся тем, что модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая по меньшей мере в 2 раза выше, чем аффинность, с которой он связывает вторую Т-клетку.

Аспект 4. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 1, отличающийся тем, что модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая по меньшей мере в 5 раза выше, чем аффинность, с которой он связывает вторую Т-клетку.

Аспект 5. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 1, отличающийся тем, что модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая по меньшей мере в 10 раз выше, чем аффинность, с которой он связывает вторую Т-клетку.

Аспект 6. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 1, отличающийся тем, что вариант иммуномодулирующего полипептида связывает ко-иммуномодулирующий полипептид с аффинностью, равной от около 10^{-4} М до около 10^{-7} М.

Аспект 7. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 1, отличающийся тем, что вариант иммуномодулирующего полипептида связывает ко-иммуномодулирующий полипептид с аффинностью, равной от около 10^{-4} М до около 10^{-6}

М.

Аспект 8. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 1, отличающийся тем, что вариант иммуномодулирующего полипептида связывает ко-иммуномодулирующий полипептид с аффинностью, равной от около 10^{-4} М до около 10^{-5} М.

Аспект 9. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 1, отличающийся тем, что отношение аффинности связывания контрольного модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, причем контрольный содержит иммуномодулирующий полипептид дикого типа, к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду с аффинностью связывания модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, содержащего вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, которую измеряют с помощью биослойной интерферометрии составляет по меньшей мере 10:1.

Аспект 10. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 1, отличающийся тем, что отношение аффинности связывания контрольного модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, причем контрольный содержит иммуномодулирующий полипептид дикого типа, к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду с аффинностью связывания модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, содержащего вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, которую измеряют с помощью биослойной интерферометрии составляет по меньшей мере 50:1.

Аспект 11. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 1, отличающийся тем, что отношение аффинности связывания контрольного модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, причем контрольный содержит иммуномодулирующий полипептид дикого типа, к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду с аффинностью связывания модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида по данному изобретению, содержащего вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, которую измеряют с помощью биослойной интерферометрии составляет по меньшей мере 10^2 :1.

Аспект 12. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 1, отличающийся тем, что отношение аффинности связывания контрольного модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, причем контрольный содержит

иммуномодулирующий полипептид дикого типа, к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду с аффинностью связывания модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, содержащего вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, которую измеряют с помощью биослойной интерферометрии составляет по меньшей мере $10^3:1$.

Аспект 13. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–12, отличающийся тем, что второй полипептид содержит полипептид Fc Ig.

Аспект 14. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 13, отличающийся тем, полипептид Fc Ig представляет собой полипептид Fc IgG1.

Аспект 15. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 14, отличающийся тем, полипептид Fc IgG1 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из N297A, L234A, L235A, L234F, L235E и P331S.

Аспект 16. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 14, отличающийся тем, что полипептид Fc IgG1 содержит замены L234A и L235A.

Аспект 17. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–16, отличающийся тем, что первый полипептид содержит пептидный линкер между эпитопом и первым полипептидом ГКГС.

Аспект 18. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 17, отличающийся тем, что линкер имеет длину от 20 до 40 аминокислот.

Аспект 19. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 17, отличающийся тем, что линкер представляет собой пептид формулы $(GGGGS)_n$, где n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Аспект 20. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–19, отличающийся тем, что первый полипептид содержит пептидный линкер между вариантом иммуномодулирующего полипептида и вторым полипептидом ГКГС.

Аспект 21. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 18, отличающийся тем, что линкер имеет длину от 20 до 40 аминокислот.

Аспект 22. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 20, отличающийся тем, что линкер представляет собой пептид формулы $(GGGGS)_n$, где n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Аспект 23. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–22, содержащий две или более копии варианта иммуномодулирующего полипептида.

Аспект 24. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 23,

отличающийся тем, что две или более копии варианта иммуномодулирующего полипептида содержат одинаковую аминокислотную последовательность.

Аспект 25. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 23 или аспекту 24, содержащий пептидный линкер между копиями.

Аспект 26. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 25, отличающийся тем, что линкер имеет длину от 20 до 40 аминокислот.

Аспект 27. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 25, отличающийся тем, что линкер представляет собой пептид формулы (GGGGS)_n, где n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Аспект 28. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–27, отличающийся тем, что вариант иммуномодулирующего полипептида содержит от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с соответствующим иммуномодулирующим полипептидом дикого типа.

Аспект 29. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 28, отличающийся тем, что иммуномодулирующий полипептид дикого типа, выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGFβ, CD70 и ICAM.

Аспект 30. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–29, отличающийся тем, что первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид β2-микроглобулина; и при этом второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I.

Аспект 31. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 30, отличающийся тем, что полипептид β2-микроглобулина содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности, равную по меньшей мере 85% с одной из аминокислотных последовательностей, представленных на фиг. 4.

Аспект 32. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 30, отличающийся тем, что полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I представляет собой тяжелую цепь HLA-A, HLA-B или HLA-C.

Аспект 33. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 32, отличающийся тем, что полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности, равную по меньшей мере 85% с аминокислотной последовательностью, представленной на фиг. 3A–3C.

Аспект 34. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из

аспектов 1–29, отличающийся тем, что первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид альфа цепи ГКГС класса II; и при этом второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид бета цепи ГКГС класса II.

Аспект 35. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–34, отличающийся тем, что мультимерный полипептид содержит полипептид Fc, и при этом полипептид Fc Ig представляет собой полипептид Fc IgG1, полипептид Fc IgG2, полипептид Fc IgG3, полипептид Fc IgG4, полипептид Fc IgA или полипептид Fc IgM.

Аспект 36. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 26, отличающийся тем, что полипептид Fc Ig содержит аминокислотную последовательность, имеющую идентичность аминокислотной последовательности, равную по меньшей мере 85% с аминокислотной последовательностью, представленной на фиг. 2A–2D.

Аспект 37. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 35 или 36, отличающийся тем, что второй полипептид содержит пептидный линкер между вторым полипептидом ГКГС и полипептидом Fc.

Аспект 38. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 37, отличающийся тем, что линкер имеет длину от 20 до 4 аминокислот.

Аспект 39. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 37, отличающийся тем, что линкер представляет собой пептид формулы $(GGGS)_n$, где n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Аспект 40. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–39, отличающийся тем, что первый полипептид и второй полипептид нековалентно связаны.

Аспект 41. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–39, отличающийся тем, что первый полипептид и второй полипептид ковалентно связаны друг с другом.

Аспект 42. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 41, отличающийся тем, что ковалентная связь осуществляется через дисульфидную связь.

Аспект 43. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 42, отличающийся тем, что дисульфидная связь связывает остаток цистеина в первом полипептиде ГКГС с остатком цистеина во втором полипептиде ГКГС.

Аспект 44. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–43, отличающийся тем, что эпитоп представляет собой эпитоп рака.

Аспект 45. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 44, отличающийся тем, что эпитоп рака представляет собой пептидный фрагмент из 4

аминокислот (ак), 5 ак, 6 ак, 7 ак, 8 ак, 9 м, 10 ак, 11 ак, 12 ак, 13 ак, 14 ак, 15 ак, 16 ак, 17 ак, 18 ак, 19 ак или 20 ак в длину полипептида MUC1, полипептида вируса папилломы человека (HPV) E6, полипептида LMP2, полипептида HPV E7, полипептида рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) vIII, полипептида HER-2/neu, полипептида 3 семейства антигенов меланомы A (MAGE A3), полипептида p53, полипептида мутанта p53, полипептида NY-ESO-1, полипептида фолат гидролазы (простат-специфический мембранный антиген; PSMA), полипептида карциноэмбрионального антигена (CEA), полипептида антигена меланомы, распознаваемого Т-клетками (melanA/MART1), полипептида Ras, полипептида gp100, полипептида протеиназы 3 (PR1), полипептида bcr-abl, полипептида тирозиназы, полипептида сурвивина, полипептида простат-специфического антигена (PSA), полипептида hTERT, полипептида точек разрыва саркомы, полипептида точек разрыва синовиальной саркомы X (SSX), полипептида EphA2, полипептида кислой фосфатазы простаты (PAP), полипептида ингибитора апоптоза меланомы a (ML-IAP), полипептида альфа-фетопротеина (AFP), полипептида молекулы адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), полипептида ERG (химерный TMPRSS2 ETS), полипептида NA17, полипептида парная коробка-3 (PAX3), полипептида киназы анапластической лимфомы (ALK), полипептида андрогенного рецептора, полипептида циклина B1, полипептида N-мус прото-онкогена (MYCN), полипептида члена семейства C гомологов гена Ras (RhoC), полипептида родственного тирозиназе белка-2 (TRP-2), полипептида мезотелина, полипептида антигена стволовых клеток простаты (PSCA), полипептида связанного с меланомой антигена-1 (MAGE A1), полипептида цитохрома P450 1B1 (CYP1B1), полипептида плацента-специфического белка 1 (PLAC1), полипептида BORIS (также известного как фактор связывания CCCTC или CTCF), полипептида ETV6-AML, полипептида антигена рака молочной железы NY-BR-1 (также упоминаемого как белок, содержащий домен анкиринового повтора 30A), полипептида регулятора сигналинга G-белка (RGS5), полипептида антигена плоскоклеточного рака, распознаваемого Т-клетками (SART3), полипептида карбоангидразы IX, полипептида парной коробки-5 (PAX5), полипептида OY-TE51 (яичковый антиген; также известный как белок, связывающий акрозин), полипептида белка спермы 17, полипептида специфичной для лимфоцитов клеточной протеин-тирозинкиназы (LCK), высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMW-MAA), якорного белка А-киназы-4 (AKAP-4), полипептида точки останова X 2 синовиальной саркомы (SSX2), полипептида члена семейства антигена X 1 (XAGE1), полипептида гомолога 3 B7 (B7H3; также известного как CD276), полипептида бобовых (LGMN1; также известного как аспарагинилэндопептидаза), полипептида тирозинкиназы с доменами гомологии Ig и

EGF-2 (Tie-2; также известного как рецептор ангиопоэтина-1), полипептида члена 4 семейства Р антигена (PAGE4), полипептида рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGF2), полипептида MAD-CT-1, полипептида белка активации фибробластов (FAP), полипептида бета-рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGF β), полипептида MAD-CT-2, полипептида связанного с Fos антигена 1 (FOSL) или полипептида опухоли Вильмса-1 (WT1).

Аспект 46. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–45, отличающийся тем, что один из первого и второго полипептидов содержит полипептид Fc Ig, при этом лекарственное средство конъюгировано с полипептидом Fc Ig.

Аспект 47. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 46, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой цитотоксических агент, выбранный из мейтансиноида, бензодиазепина, таксоида, СС-1065, дуокармицина, аналога дуокармицина, калихеамицина, доластатина, аналога доластатина, ауристатина, томаймицина и лептомицина или пролекарства любого из вышеперечисленных.

Аспект 48. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 46, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой ретиноид.

Аспект 49. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–48, отличающийся тем, что аффинность связывания определяют при помощи биослойной интерферометрии.

Аспект 50. Способ модулирования иммунного ответа у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида по любому из аспектов 1–49, причем указанное введение индуцирует эпитоп-специфический Т-клеточный ответ и эпитоп-неспецифический Т-клеточный ответ, причем отношение эпитоп-специфического Т-клеточного ответа к эпитоп-неспецифическому Т-клеточному ответу составляет по меньшей мере 2:1.

Аспект 51. Способ по аспекту 50, отличающийся тем, что отношение эпитоп-специфического Т-клеточного ответа к эпитоп-неспецифическому Т-клеточному ответу составляет по меньшей мере 5:1.

Аспект 52. Способ по аспекту 50, отличающийся тем, что отношение эпитоп-специфического Т-клеточного ответа к эпитоп-неспецифическому Т-клеточному ответу составляет по меньшей мере 10:1.

Аспект 53. Способ по аспекту 50, отличающийся тем, что отношение эпитоп-специфического Т-клеточного ответа к эпитоп-неспецифическому Т-клеточному ответу составляет по меньшей мере 25:1.

Аспект 54. Способ по аспекту 50, отличающийся тем, что отношение эпитоп-

специфического Т-клеточного ответа к эпитоп-неспецифическому Т-клеточному ответу составляет по меньшей мере 50:1.

Аспект 55. Способ по аспекту 50, отличающийся тем, что отношение эпитоп-специфического Т-клеточного ответа к эпитоп-неспецифическому Т-клеточному ответу составляет по меньшей мере 100:1.

Аспект 56. Способ по любому из аспектов 50-55, отличающийся тем, что индивидиум представляет собой человека.

Аспект 57. Способ по любому из аспектов 50-56, отличающийся тем, что указанное модулирование включает усиление цитотоксического ответа Т-клеток на раковые клетки.

Аспект 58. Способ по любому из аспектов 50-57, отличающийся тем, что указанное модулирование включает снижение Т-клеточного ответа на аутоантиген.

Аспект 59. Способ по любому из аспектов 50-58, отличающийся тем, что указанное введение является внутривенным, подкожным, внутримышечным, системным, внутрилимфатическим, дистальным по отношению к месту лечения, местным или в месте лечения или рядом с ним.

Аспект 60. Способ по любому из аспектов 50-59, отличающийся тем, что эпитоп-неспецифический Т-клеточный ответ меньше, чем эпитоп-специфический Т-клеточный ответ, который индуцируется контрольным модулирующим Т-клетки мультимерным полипептидом, содержащим соответствующий иммуномодулирующий полипептид дикого типа.

Аспект 61. Способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида по любому из аспектов 1-49.

Аспект 62. Одна или более нуклеиновых кислот, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и второй полипептиды модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида по любому из аспектов 1-49.

Аспект 63. Одна или более нуклеиновых кислот по аспекту 62, отличающаяся тем, что первый полипептид кодируется первой нуклеотидной последовательностью, второй полипептид кодируется второй нуклеотидной последовательностью, и при этом первая и вторая нуклеотидные последовательности присутствуют в одной нуклеиновой кислоте.

Аспект 64. Одна или более нуклеиновых кислот по аспекту 62, отличающаяся тем, что первый полипептид кодируется первой нуклеотидной последовательностью, присутствующей в первой нуклеиновой кислоте, а второй полипептид кодируется второй нуклеотидной последовательностью, присутствующей во второй нуклеиновой кислоте.

Аспект 65. Одна или более нуклеиновых кислот по аспекту 63, отличающаяся тем,

что первая нуклеотидная последовательность и вторая нуклеотидная последовательность функционально связаны с элементом контроля транскрипции.

Аспект 66. Одна или более нуклеиновых кислот по аспекту 64, отличающаяся тем, что первая нуклеотидная последовательность функционально связана с элементом контроля транскрипции, а вторая нуклеотидная последовательность функционально связана с элементом контроля транскрипции.

Аспект 67. Одна или более нуклеиновых кислот по аспекту 63, отличающиеся тем, что одна нуклеиновая кислота присутствует в рекомбинантном векторе экспрессии.

Аспект 68. Одна или более нуклеиновых кислот по аспекту 67, отличающиеся тем, что первая нуклеиновая кислота присутствует в первом рекомбинантном векторе экспрессии, а вторая нуклеиновая кислота присутствует во втором рекомбинантном векторе экспрессии.

Аспект 69. Композиция, содержащая: а) модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–49; и б) фармацевтически приемлемый наполнитель.

Аспект 70. Композиция, содержащая: а) одну или более нуклеиновых кислот по любому из аспектов 62–68; и б) фармацевтически приемлемый наполнитель.

Аспект 71. Композиция, содержащая: а) модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 1–49; и б) солевой раствор.

Аспект 72. Композиция по аспекту 71, отличающаяся тем, что солевой раствор представляет собой 0,9% NaCl.

Аспект 73. Композиция по аспекту 71 или 72, отличающаяся тем, что композиция является стерильной.

Аспект 74. Способ получения модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, содержащего один или более вариантов иммуномодулирующих полипептидов, которые проявляют пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего родительского иммуномодулирующего полипептида дикого типа к ко-иммуномодулирующему полипептиду, включающий отбор из библиотеки модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, включающей множество элементов, элемента, который проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, причем множество элементов содержит: а) первый полипептид, содержащий: i) эпитоп; и ii) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС); и б) второй полипептид, содержащий: i) второй полипептид ГКГС; и ii) необязательно полипептид Fc иммуноглобулина (Ig) или каркас не от Ig, при этом элементы библиотеки содержат множество вариантов иммуномодулирующего

полипептида, присутствующего в первом полипептиде, во втором полипептиде или как в первом, так и во втором полипептиде.

Aspect75. Способ получения модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, содержащего один или более вариантов иммуномодулирующих полипептидов, которые проявляют сниженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего родительского иммуномодулирующего полипептида дикого типа для ко-го иммуномодулирующего полипептида, включающий: А) обеспечение библиотеки модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, содержащей множество элементов, причем множество элементов содержит: а) первый полипептид, содержащий: i) эпитоп и ii) первый основной полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), и b) второй полипептид, содержащий: i) второй полипептид ГКГС; и ii) необязательно полипептид Fc иммуноглобулина (Ig) или каркас не от Ig, причем элементы библиотеки содержат разные варианты иммуномодулирующего полипептида, представленного в первом полипептиде, втором полипептиде или как на первом, так и на втором полипептиде; и В) выбор из библиотеки элемента, который проявляет пониженную аффинность с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом.

Аспект 76. Способ по аспекту 74 или 75, отличающийся тем, что указанный отбор включает определение аффинности с использованием биослойной интерферометрии связывания между элементами библиотеки мультимерных полипептидов модулирующих Т-клетки и когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом.

Аспект 77. Способ по любому из аспектов 74–76, отличающийся тем, что модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид является таким, как определено в любом из аспектов 1–49.

Аспект 78. Способ по любому из аспектов 74–77, дополнительно включающий: а) приведение в контакт выбранного элемента библиотеки мультимерных полипептидов, модулирующих Т-клетки с Т-клеткой-мишенью, экспрессирующей на своей поверхности: i) когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывает родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа; и ii) рецептор Т-клеток, который связывается с эпитопом, причем элемент библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов содержит эпитопную метку, так что элемент библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов связывается с Т-клеткой-мишенью; б) приведение в контакт выбранного элемента библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов, связанного с Т-клеткой-мишенью, с флуоресцентно меченным связывающим агентом, который связывается с эпитопной меткой, с

образованием комплекса выбранный элемент библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов/Т-клетка-мишень/связывающий агента; и с) измерение средней интенсивности флуоресценции (MFI) комплекса выбранного элемента библиотеки мультимерных полипептидов, модулирующих Т-клетки/Т-клетка-мишень/связывающий агент с использованием проточной цитометрии, причем MFI, измеренная в диапазоне концентраций выбранного элемента библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов, обеспечивает измерение аффинности и кажущейся авидности; при этом выбранный элемент библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов, который селективно связывает Т-клетку-мишень, сравнивают со связыванием элемента библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов с контрольной Т-клеткой, содержащей: i) когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, который связывает родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа; и ii) Т-клеточный рецептор, который связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, присутствующего в элементе библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов, идентифицирован как селективно связывающийся с Т-клеткой-мишенью.

Аспект 79. Способ по аспекту 78, отличающийся тем, что связывающий агент представляет собой антитело, специфичное к метке эпитопа.

Аспект 80. Способ по любому из аспектов 74–79, отличающийся тем, что вариант иммуномодулирующего полипептида содержит от 1 до 20 аминокислотных замен по сравнению с соответствующим родительским иммуномодулирующим полипептидом дикого типа.

Аспект 81. Способ по любому из аспектов 74–80, отличающийся тем, что модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид содержит два варианта иммуномодулирующих полипептидов.

Аспект 82. Способ по аспекту 81, отличающийся тем, что два варианта иммуномодулирующих полипептидов содержат одинаковую аминокислотную последовательность.

Аспект 83. Способ по аспекту 81 или 82, отличающийся тем, что первый полипептид содержит один из двух вариантов иммуномодулирующих полипептидов, и при этом второй полипептид содержит второй из двух вариантов иммуномодулирующих полипептидов.

Аспект 84. Способ по аспекту 81 или 82, отличающийся тем, что два варианта иммуномодулирующих полипептидов находятся в одной и той же полипептидной цепи модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида.

Аспект 85. Способ по аспекту 84, отличающийся тем, что два варианта иммуномодулирующих полипептидов находятся в первом полипептиде модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида.

Аспект 86. Способ по аспекту 84, отличающийся тем, что два варианта иммуномодулирующих полипептидов находятся во втором полипептиде модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида.

Аспект 87. Способ по любому из аспектов 74–86, дополнительно включающий выделение выбранного элемента библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов из библиотеки.

Аспект 88. Способ по любому из аспектов 74–87, дополнительно включающий предоставление нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую выбранный элемент библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов.

Аспект 89. Способ по аспекту 88, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота присутствует в рекомбинантном векторе экспрессии.

Аспект 90. Способ по аспекту 88 или 89, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность функционально связана с элементом контроля транскрипции, который функционирует в эукариотической клетке.

Аспект 91. Способ по аспекту 88–90, отличающийся тем, что дополнительно включает введение нуклеиновой кислоты в эукариотическую клетку-хозяина и культивирование клетки в жидкой среде для синтеза кодированного выбранного элемента библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов в клетке.

Аспект 92. Способ по аспекту 91, дополнительно включающий выделение синтезированного выбранного элемента библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов из клетки или из жидкой культуральной среды, содержащей клетку.

Аспект 93. Способ по любому из аспектов 74–92, отличающийся тем, что выбранный элемент библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов содержит полипептид Fc Ig.

Аспект 94. Способ по аспекту 93, дополнительно включающий конъюгирование лекарственного средства с полипептидом Fc Ig.

Аспект 95. Способ по аспекту 94, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой цитотоксический агент, выбранный из мейтансиноида, бензодиазепина, таксоида, СС-1065, дуокармицина, аналога дуокармицина, калихеамицина, доластатина, аналога доластатина, ауристатиона, томаймицина и

лептомицина или пролекарства любого из вышеперечисленных.

Аспект 96. Способ по аспекту 94, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой ретиноид.

Аспект 97. Способ по любому из аспектов 74–96, отличающийся тем, что родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа и когнатные иммуномодулирующие полипептиды выбирают из: IL-2 и рецептора IL-2; 4-1BBL и 4-1BB; PD-L1 и PD-1; FasL и Fas; TGF β и рецептора TGF β ; CD80 и CD28; CD86 и CD28; OX40L и OX40; CD70 CD27; ICOS-L и ICOS; ICAM и LFA-1; JAG1 и Notch; JAG1 и CD46; CD80 и CTLA4, и CD86 и CTLA4.

Аспект 98. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид, содержащий: А) первый мультимерный полипептидный гетеродимер по любому из аспектов 1–49, и В) второй мультимерный полипептидный гетеродимер по любому из аспектов 1–49, и при этом первый гетеродимер и второй гетеродимер ковалентно связаны друг с другом.

Аспект 99. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 98, отличающийся тем, что первый гетеродимер и второй гетеродимер ковалентно связаны друг с другом через С-концевую область второго полипептида первого гетеродимера и С-концевую область второго полипептида второго гетеродимера.

Аспект 100. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 98 или 99, отличающийся тем, что пептидный эпитоп первого гетеродимера и пептидный эпитоп второго гетеродимера содержат одну и ту же аминокислотную последовательность.

Аспект 101. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 98–100, отличающийся тем, что первый полипептид ГКГС первого и второго гетеродимера представляет собой β 2-микроглобулин ГКГС класса I, и при этом второй полипептид ГКГС первого и второго гетеродимера представляет собой тяжелую цепь ГКГС класса I.

Аспект 102. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 98–101, отличающийся тем, что один или более иммуномодулирующих полипептидов первого гетеродимера и один или более иммуномодулирующих полипептидов второго гетеродимера содержат одну и ту же аминокислотную последовательность или содержат разные аминокислотные последовательности.

Аспект 103. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 98–102, отличающийся тем, что один или более иммуномодулирующих полипептидов первого гетеродимера и один или более иммуномодулирующих полипептидов второго гетеродимера являются вариантами иммуномодулирующих

полипептидов, которые содержат от 1 до 10 аминокислотных замен по сравнению с соответствующим родительским иммуномодулирующим полипептидом дикого типа, и при этом от 1 до 10 аминокислотных замен приводят к снижению аффинного связывания варианта иммуномодулирующего полипептида с когнатным иммуномодулирующим полипептидом.

Аспект 104. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 98–103, отличающийся тем, что один или более иммуномодулирующих полипептидов первого гетеродимера и один или более иммуномодулирующих полипептидов второго гетеродимера выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, ICAM, вариантов IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, и ICAM, и их комбинаций.

Аспект 105. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 104, отличающийся тем, что родительский иммуномодулирующий полипептид дикого типа и когнатные иммуномодулирующие полипептиды выбирают из: IL-2 и рецептора IL-2; 4-1BBL и 4-1BB; PD-L1 и PD-1; FasL и Fas; TGF β и рецептора TGF β ; CD80 и CD28; CD86 и CD28; OX40L и OX40; CD70 CD27; ICOS-L и ICOS; ICAM и LFA-1; JAG1 и Notch; JAG1 и CD46; CD80 и CTLA4, и CD86 и CTLA4.

Аспект 106. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 98–105, отличающийся тем, что пептидный эпитоп представляет собой эпитоп рака.

Аспект 107. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 106, отличающийся тем, что эпитоп рака представляет собой пептидный фрагмент из 4 аминокислот (ак), 5 ак, 6 ак, 7 ак, 8 ак, 9 м, 10 ак, 11 ак, 12 ак, 13 ак, 14 ак, 15 ак, 16 ак, 17 ак, 18 ак, 19 ак или 20 ак в длину полипептида MUC1, полипептида вируса папилломы человека (HPV) E6, полипептида LMP2, полипептида HPV E7, полипептида рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) vIII, полипептида HER-2/neu, полипептида 3 семейства антигенов меланомы A (MAGE A3), полипептида p53, полипептида мутанта p53, полипептида NY-ESO-1, полипептида фолат гидролазы (простат-специфический мембранный антиген; PSMA), полипептида карциноэмбрионального антигена (CEA), полипептида антигена меланомы, распознаваемого Т-клетками (melanA/MART1), полипептида Ras, полипептида gp100, полипептида протеиназы 3 (PR1), полипептида bcr-abl, полипептида тирозиназы, полипептида сурвивина, полипептида простат-специфического антигена (PSA), полипептида hTERT, полипептида точек разрыва саркомы, полипептида точек разрыва сновальной саркомы X (SSX), полипептида EphA2,

полипептида кислой фосфатазы простаты (PAP), полипептида ингибитора апоптоза меланомы а (ML-IAP), полипептида альфа-фетопротейна (AFP), полипептида молекулы адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), полипептида ERG (химерный TMPRSS2 ETS), полипептида NA17, полипептида парная коробка-3 (PAX3), полипептида киназы анапластической лимфомы (ALK), полипептида андрогенного рецептора, полипептида циклина B1, полипептида N-мус прото-онкогена (MYCN), полипептида члена семейства C гомологов гена Ras (RhoC), полипептида родственного тирозиназе белка-2 (TRP-2), полипептида мезотелина, полипептида антигена стволовых клеток простаты (PSCA), полипептида связанного с меланомой антигена-1 (MAGE A1), полипептида цитохрома P450 1B1 (CYP1B1), полипептида плацента-специфического белка 1 (PLAC1), полипептида BORIS (также известного как фактор связывания CCCTC или CTCF), полипептида ETV6-AML, полипептида антигена рака молочной железы NY-BR-1 (также упоминаемого как белок, содержащий домен анкиринового повтора 30A), полипептида регулятора сигналинга G-белка (RGS5), полипептида антигена плоскоклеточного рака, распознаваемого Т-клетками (SART3), полипептида карбоангидразы IX, полипептида парной коробки-5 (PAX5), полипептида OY-TE51 (яичковый антиген; также известный как белок, связывающий акрозин), полипептида белка спермы 17, полипептида специфичной для лимфоцитов клеточной протеин-тирозинкиназы (LCK), высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMW-MAA), якорного белка А-киназы-4 (AKAP-4), полипептида точки останова X 2 синовиальной саркомы (SSX2), полипептида члена семейства антигена X 1 (XAGE1), полипептида гомолога 3 B7 (B7H3; также известного как CD276), полипептида бобовых (LGMN1; также известного как аспарагинилэндопептидаза), полипептида тирозинкиназы с доменами гомологии Ig и EGF-2 (Tie-2; также известного как рецептор ангиопоэтина-1), полипептида члена 4 семейства Р антигена (PAGE4), полипептида рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGF2), полипептида MAD-CT-1, полипептида белка активации фибробластов (FAP), полипептида бета-рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGF β), полипептида MAD-CT-2, полипептида связанного с Fos антигена 1 (FOSL) или полипептида опухоли Вильмса-1 (WT1).

Аспект 108. Способ доставки костимулирующего (т.е. иммуномодулирующего) полипептида селективно к Т-клеткам-мишеням, включающий приведение в контакт смешанной популяции Т-клеток с мультимерным полипептидом по любому из аспектов 1–49 и 98–107, причем смешанная популяция Т-клеток включают Т-клетки-мишени и Т-клетки, не являющиеся мишенями, причем Т-клетки-мишени являются специфичными для эпитопа, присутствующего в мультимерном полипептиде, и при этом указанное

приведение в контакт доставляет один или более костимулирующих полипептидов, присутствующих в мультимерном полипептиде, к Т клетке-мишени.

Аспект 109. Способ по аспекту 108, отличающийся тем, что популяция Т-клеток находится *in vitro*.

Аспект 110. Способ по аспекту 108, отличающийся тем, что популяция Т-клеток находится *in vivo* у индивидуума.

Аспект 111. Способ по аспекту 110, включающий введение мультимерного полипептида индивидууму.

Аспект 112. Способ по любому из аспектов 108-111, отличающийся тем, что Т-клетка-мишень представляет собой регуляторную Т-клетку.

Аспект 113. Способ по любому из аспектов 108-111, отличающийся тем, что Т-клетка представляет собой цитотоксическую Т-клетку.

Аспект 114. Способ по аспекту 108, отличающийся тем, что смешанная популяция Т-клеток представляет собой популяцию *in vitro* смешанных Т-клеток, полученных от индивидуума, и при этом указанное приведение в контакт приводит к активации и/или пролиферации Т-клеток-мишеней, создавая популяцию активированных и/или пролиферированных Т-клеток-мишеней.

Аспект 115. Способ по аспекту 114, дополнительно включающий введение популяции активированных и/или пролиферированных Т-клеток-мишеней индивидууму.

Аспект 116. Способ обнаружения в смешанной популяции Т-клеток, полученных от индивидуума, наличия Т-клетки-мишени, которая связывает эпитоп, представляющий интерес, включающий: а) приведение в контакт *in vitro* смешанной популяции Т-клеток с мультимерным полипептидом по любому из аспектов 1–49 и 98–107, причем мультимерный полипептид содержит интересующий эпитоп; и б) обнаружение активации и/или пролиферации Т-клеток в ответ на упомянутое приведение в контакт, причем активирование и/или пролиферация Т-клеток указывает на наличие Т-клетки-мишени.

Аспект 117. Способ по аспектам 108-115, отличающийся тем, что один или более костимулирующих полипептидов первого гетеродимера выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, ICAM, вариантов IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, и ICAM, и их комбинаций, и

при этом один или более костимулирующих полипептидов второго гетеродимера выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, ICAM, вариантов IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, и ICAM, и их комбинаций.

Аспект 118. Способ по аспекту 117, отличающийся тем, что один или более костимулирующих полипептидов первого гетеродимера выбирают из группы, состоящей из IL-2, варианта IL-2 и их комбинаций, а один или более костимулирующих полипептидов второго гетеродимера выбирают из группы, состоящей из IL-2, варианта IL-2 и их комбинаций.

Аспект 119. Способ по аспекту 117, отличающийся тем, что один или более костимулирующих полипептидов первого гетеродимера выбирают из группы, состоящей из 4-1BBL, варианта 4-1BBL и их комбинаций, а один или более костимулирующих полипептидов второго гетеродимера выбирают из группы, состоящей из 4-1BBL, варианта 4-1BBL и их комбинаций.

Аспект 120. Способ по аспекту 117, отличающийся тем, что один или более костимулирующих полипептидов первого гетеродимера выбирают из группы, состоящей из CD80, варианта CD80 и их комбинаций, а один или более костимулирующих полипептидов второго гетеродимера выбирают из группы, состоящей из CD80, варианта CD80 и их комбинаций.

Аспект 121. Способ по аспекту 117, отличающийся тем, что первый гетеродимер содержит по меньшей мере два костимулирующих полипептида, каждый из которых независимо выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, ICAM, вариантов IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, и ICAM, и их комбинаций, и

при этом второй гетеродимер содержит по меньшей мере два костимулирующих полипептида, каждый из которых независимо выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, ICAM, вариантов IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, и ICAM, и их комбинаций.

Аспект 122. Способ по аспекту 121, отличающийся тем, что каждый из по меньшей мере двух костимулирующих полипептидов первого гетеродимера независимо выбирают из группы, состоящей из IL-2 и вариантов IL-2, и один или более костимулирующих полипептидов второго гетеродимера независимо выбирают из группы, состоящей из IL-2 и варианта IL-2.

Аспект 123. Способ по аспекту 121, отличающийся тем, что каждый из по меньшей мере двух костимулирующих полипептидов первого гетеродимера независимо выбирают из группы, состоящей из 4-1BBL и вариантов 4-1BBL, а один или более костимулирующих полипептидов второго гетеродимера независимо выбирают из группы, состоящей из 4-1BBL и варианта 4-1BBL.

Аспект 124. Способ по аспекту 121, отличающийся тем, что каждый из по меньшей мере двух костимулирующих полипептидов первого гетеродимера независимо выбирают из группы, состоящей из CD80 и вариантов CD80, а один или более костимулирующих полипептидов второго гетеродимера независимо выбирают из группы, состоящей из CD80 и варианта CD80.

Аспект 125. Способ по аспекту 121, отличающийся тем, что по меньшей мере один из по меньшей мере двух костимулирующих полипептидов первого гетеродимера представляет собой CD80 или вариант CD80, а по меньшей мере один из по меньшей мере двух костимулирующих полипептидов второго гетеродимера представляет собой 4-1BBL или вариант 4-1BBL, и

при этом по меньшей мере один из по меньшей мере двух костимулирующих полипептидов второго гетеродимера представляет собой CD80 или вариант CD80, а по меньшей мере один из по меньшей мере двух костимулирующих полипептидов второго гетеродимера представляет собой 4-1BBL или вариант 4-1BBL.

Аспект 126. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из аспектов 98–107, отличающийся тем, что один или более иммуномодулирующих (т.е. костимулирующих) полипептидов первого гетеродимера выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70 и ICAM, вариантов IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70 и ICAM, и их комбинаций, и

при этом один или более иммуномодулирующих (т.е. костимулирующих) полипептидов второго гетеродимера выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70 и ICAM, вариантов IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70 и ICAM, и их комбинаций.

Аспект 127. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 126, отличающийся тем, что один или более иммуномодулирующих полипептидов первого гетеродимера выбирают из группы, состоящей из IL-2, варианта IL-2 и их комбинаций, а один или более иммуномодулирующих полипептидов второго гетеродимера выбирают из группы, состоящей из IL-2, варианта IL-2 и их комбинаций.

Аспект 128. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 126, отличающийся тем, что один или более иммуномодулирующих полипептидов первого гетеродимера выбирают из группы, состоящей из 4-1BBL, варианта 4-1BBL и их комбинаций, а один или более иммуномодулирующих полипептидов второго гетеродимера выбирают из группы, состоящей из 4-1BBL, варианта 4-1BBL и их

комбинаций.

Аспект 129. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 126, отличающийся тем, что один или более иммуномодулирующих полипептидов первого гетеродимера выбирают из группы, состоящей из CD80, варианта CD80 и их комбинаций, а один или более иммуномодулирующих полипептидов второго гетеродимера выбирают из группы, состоящей из CD80, варианта CD80 и их комбинаций.

Аспект 130. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 126, отличающийся тем, что первый гетеродимер содержит по меньшей мере два иммуномодулирующих полипептида, каждый из которых независимо выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, ICAM, вариантов IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, и ICAM, и их комбинаций, и

при этом первый второй гетеродимер содержит по меньшей мере два иммуномодулирующих полипептида, каждый из которых независимо выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, ICAM, вариантов IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70, и ICAM, и их комбинаций.

Аспект 131. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 130, отличающийся тем, что каждый из по меньшей двух иммуномодулирующих полипептидов первого гетеродимера независимо выбирают из группы, состоящей из IL-2 и вариантов IL-2, а один или более иммуномодулирующих полипептидов второго гетеродимера независимо выбирают из группы, состоящей из IL-2 и варианта IL-2.

Аспект 132. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 130, отличающийся тем, что каждый из по меньшей двух иммуномодулирующих полипептидов первого гетеродимера независимо выбирают из группы, состоящей из 4-1BBL и вариантов 4-1BBL, а один или более иммуномодулирующих полипептидов второго гетеродимера независимо выбирают из группы, состоящей из 4-1BBL и вариантов 4-1BBL.

Аспект 133. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 130, отличающийся тем, что каждый из по меньшей двух иммуномодулирующих полипептидов первого гетеродимера независимо выбирают из группы, состоящей из CD80 и вариантов CD80, а один или более иммуномодулирующих полипептидов второго гетеродимера независимо выбирают из группы, состоящей из CD80 и вариантов CD80.

Аспект 134. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по аспекту 130, отличающийся тем, что по меньшей мере один из по меньшей мере двух

иммуномодулирующих полипептидов первого гетеродимера представляет собой CD80 или вариант CD80, и по меньшей мере один из по меньшей мере двух иммуномодулирующих полипептидов первого гетеродимера представляет собой 4-1BBL или вариант 4-1BBL, и при этом по меньшей мере один из по меньшей мере двух иммуномодулирующих полипептидов второго гетеродимера представляет собой CD80 или вариант CD80, и по меньшей мере один из по меньшей мере двух иммуномодулирующих полипептидов второго гетеродимера представляет собой 4-1BBL или вариант 4-1BBL.

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид, содержащий:

а) первый полипептид, содержащий, в направлении от N-конца к С-концу:

i) эпитоп;

ii) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС); и

б) второй полипептид, содержащий, в направлении от N-конца к С-концу:

i) второй полипептид ГКГС; и

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

причем мультимерный полипептид содержит один или более иммуномодулирующих доменов, при этом по меньшей мере один из одного или более иммуномодулирующих доменов расположен:

А) на С-конце первого полипептида;

В) на N-конце второго полипептида;

С) на С-конце второго полипептида; или

Д) на С-конце первого полипептида и на N-конце второго полипептида,

при этом, по меньшей мере один из одного или более иммуномодулирующих доменов представляет собой вариант иммуномодулирующего полипептида, который проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего иммуномодулирующего полипептида дикого типа для когнатного ко-иммуномодулирующего полипептида,

и при этом эпитоп связывается с рецептором Т-клеток (TCR) на Т-клетке с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} M,

так, что:

i) модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая на по меньшей мере 25% выше, чем аффинность, с которой модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид связывает вторую Т-клетку,

при этом первая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид и TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} M, и

при этом вторая Т-клетка экспрессирует на своей поверхности когнатный ко-иммуномодулирующий полипептид, но не экспрессирует на своей поверхности TCR, который связывает эпитоп с аффинностью, равной по меньшей мере 10^{-7} M, и/или

ii) отношение аффинности связывания контрольного модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, причем контрольный содержит иммуномодулирующий

полипептид дикого типа, к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду с аффинностью связывания модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, содержащего вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа, к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, которую измеряют с помощью биослойной интерферометрии, находится в диапазоне от 1,5:1 до 10^6 :1.

2. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по п. 1, отличающийся тем, что:

а) модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид связывается с первой Т-клеткой с аффинностью, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере, в 10 раз выше, чем аффинность, с которым он связывает со второй Т-клеткой; и/или

б) вариант иммуномодулирующего полипептида связывается с ко-иммуномодулирующим полипептидом с аффинностью от около 10^{-4} М до около 10^{-7} М, от около 10^{-4} М до около 10^{-6} М, от около 10^{-4} М до около 10^{-5} М; и/или

с) при этом отношение аффинности связывания контрольного модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, причем контрольный содержит иммуномодулирующий полипептид дикого типа, к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду с аффинностью связывания модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, содержащего вариант иммуномодулирующего полипептида дикого типа, к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, которую измеряют с помощью биослойной интерферометрии, составляет по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 10^2 :1 или по меньшей мере 10^3 :1.

3. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что второй полипептид содержит полипептид Fc Ig, необязательно, при этом полипептид Fc Ig, необязательно, при этом, полипептид Fc IgG1 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из N297A, L234A, L235A, L234F, L235E и P331S.

4. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из пп. 1–3, отличающийся тем, что первый полипептид содержит пептидный линкер между эпитопом и первым полипептидом ГКГС и/или при этом первый полипептид содержит пептидный линкер между вариантом иммуномодулирующего полипептида и вторым полипептидом ГКГС.

5. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из пп. 1–4, содержащий две или более копии варианта иммуномодулирующего полипептида.

6. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из пп. 1–5,

отличающийся тем, что иммуномодулирующий полипептид дикого типа, выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70 и ICAM.

7. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из пп. 1–6, отличающийся тем, что:

а) первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид β 2-микроглобулина; и при этом второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид тяжелой цепи ГКГС класса I; или

б) первый полипептид ГКГС представляет собой полипептид альфа цепи ГКГС класса II; и при этом второй полипептид ГКГС представляет собой полипептид бета цепи ГКГС класса II.

8. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из пп. 1–7, отличающийся тем, что мультимерный полипептид содержит полипептид Fc, и при этом полипептид Fc Ig представляет собой полипептид Fc IgG1, полипептид Fc IgG2, полипептид Fc IgG3, полипептид Fc IgG4, полипептид Fc IgA или полипептид Fc IgM.

9. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что:

а) первый полипептид и второй полипептид не являются ковалентно связанными; или

б) первый полипептид и второй полипептид, ковалентно связаны друг с другом, необязательно, при этом ковалентная связь осуществляется посредством дисульфидной связи.

10. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из пп. 1–9, отличающийся тем, что эпитоп представляет собой эпитоп рака.

11. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из пп. 1–10, отличающийся тем, что один из первого и второго полипептидов содержит полипептид Fc Ig, при этом лекарственное средство конъюгировано с полипептидом Fc Ig.

12. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из пп. 1–11, отличающийся тем, что аффинность связывания определяют при помощи биослойной интерферометрии.

13. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид, содержащий:

А) первый гетеродимер, содержащий:

а) первый полипептид, содержащий:

i) пептидный эпитоп; и

ii) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости

(ГКГС); и

b) второй полипептид, содержащий:

i) второй полипептид ГКГС,

причем первый гетеродимер содержит один или более иммуномодулирующих полипептидов; и

B) второй гетеродимер, содержащий:

a) первый полипептид, содержащий:

i) пептидный эпитоп; и

ii) первый полипептид ГКГС; и

b) второй полипептид, содержащий:

i) второй полипептид ГКГС,

причем второй гетеродимер содержит один или более иммуномодулирующих полипептидов, и

при этом первый гетеродимер и второй гетеродимер ковалентно связаны друг с другом.

14. Модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по п. 13, отличающийся тем, что иммуномодулирующий полипептид первого гетеродимера и иммуномодулирующий полипептид второго гетеродимера оба выбирают из группы, состоящей из IL-2, 4-1BBL, PD-L1, CD80, CD86, ICOS-L, OX-40L, FasL, JAG1, TGF β , CD70 и ICAM.

15. Одна или более нуклеиновых кислот, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и второй полипептиды модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида по любому из пп. 1–14.

16. Композиция, содержащая:

a1) модулирующий Т-клетки мультимерный полипептид по любому из пп. 1–14 и

b1) фармацевтически приемлемый эксципиент; или

a2) одну или более нуклеиновых кислот по п. 15; и

b2) фармацевтически приемлемый эксципиент.

17. Способ модуляции иммунного ответа у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида по любому из пп. 1–14,

причем введение индуцирует эпитоп-специфический Т-клеточный ответ и эпитоп-неспецифический Т-клеточный ответ,

при этом отношение эпитоп-специфического Т-клеточного ответа к эпитоп-неспецифическому Т-клеточному ответу составляет по меньшей мере 2:1.

18. Способ доставки костимулирующего полипептида выборочно к Т-клетке-мишени, включающий приведение в контакт смешанной популяции Т-клеток с мультимерным полипептидом по любому из пп. 1–14, при этом смешанная популяция Т-клеток включает Т-клетки-мишени и Т-клетки, не являющиеся мишенями,

при этом Т-клетки-мишени являются специфичными для эпитопа, присутствующего в мультимерном полипептиде, и

при этом приведение в контакт доставляет костимулирующий полипептид, присутствующий в пределах мультимерного полипептида, к Т-клетке-мишени.

19. Способ обнаружения в смешанной популяции Т-клеток, полученных от индивидуума, наличия Т-клетки-мишени, которая связывает эпитоп, представляющий интерес, включающий:

а) приведение в контакт *in vitro* смешанной популяции Т-клеток с мультимерным полипептидом по любому из пп. 1–14, причем мультимерный полипептид содержит эпитоп, представляющий интерес; и

б) обнаружение активации и/или пролиферации Т-клеток в ответ на упомянутое приведение в контакт, причем активирование и/или пролиферация Т-клеток указывает на наличие Т-клетки-мишени.

20. Способ получения модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, содержащего один или более вариантов иммуномодулирующих полипептидов, которые проявляют сниженную аффинность с когнатным ко-иммуномодулирующим полипептидом по сравнению с аффинностью соответствующего родительского иммуномодулирующего полипептида дикого типа к ко-иммуномодулирующему полипептиду, причем способ включает выбор из библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов, включающей множество элементов, элемента, который проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду, при этом множество элементов включает:

а) первый полипептид, содержащий:

i) эпитоп; и

ii) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС); и

б) второй полипептид, содержащий:

i) второй полипептид ГКГС; и

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

при этом элементы библиотеки содержат множество вариантов

иммуномодулирующего полипептида, присутствующих в первом полипептиде, втором полипептиде или как в первом, так и во втором полипептиде.

21. Способ получения модулирующего Т-клетки мультимерного полипептида, содержащего один или более вариантов иммуномодулирующих полипептидов, которые проявляют сниженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду по сравнению с аффинностью соответствующего родительского иммуномодулирующего полипептида дикого типа для ко-иммуномодулирующего полипептида, включающий:

А) обеспечение библиотеки модулирующих Т-клетки мультимерных полипептидов, содержащих множество членов, причем множество членов содержит:

а) первый полипептид, содержащий:

i) эпитоп; и

ii) первый полипептид главного комплекса гистосовместимости (ГКГС); и

б) второй полипептид, содержащий:

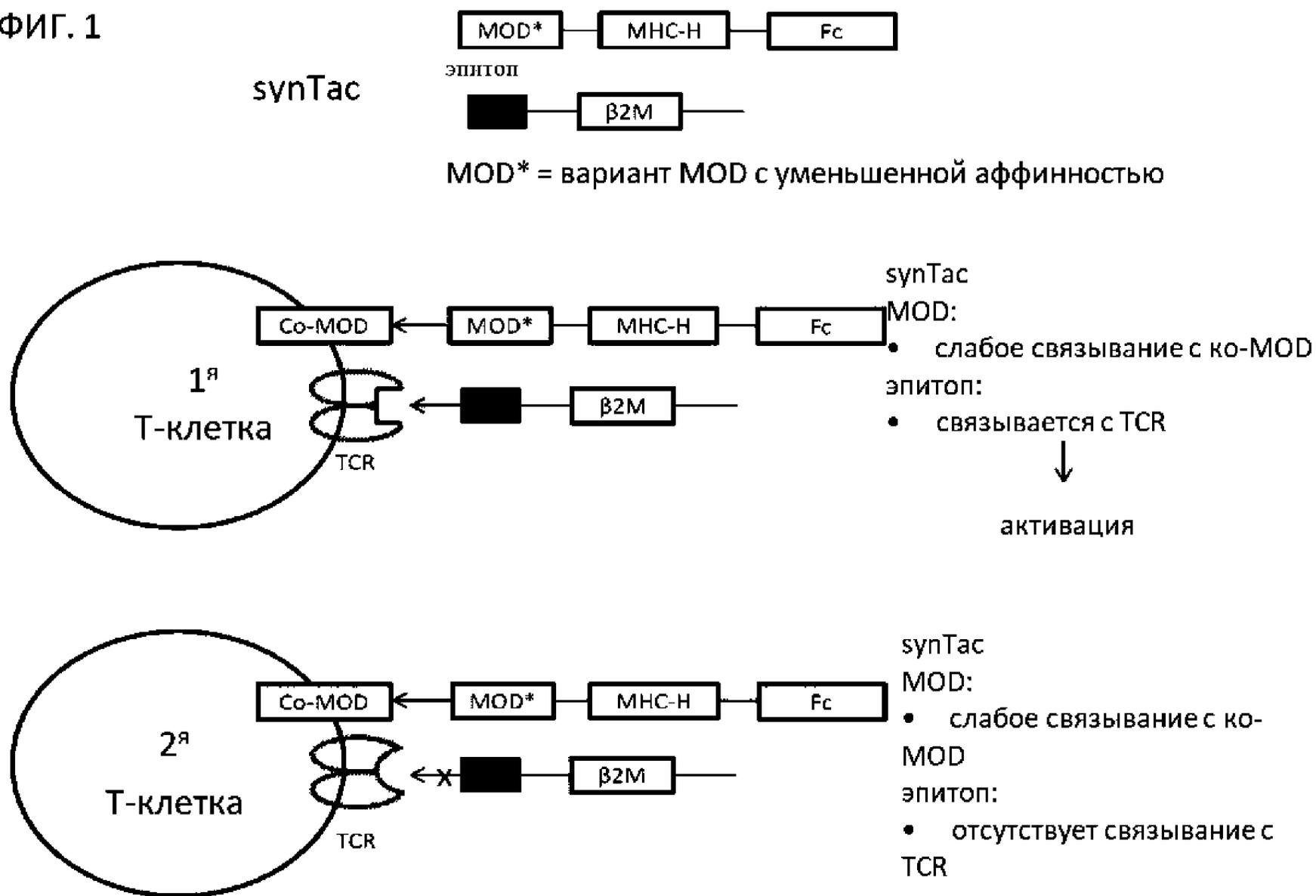
i) второй полипептид ГКГС; и

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

при этом элементы библиотеки содержат множество вариантов иммуномодулирующего полипептида, присутствующих в первом полипептиде, втором полипептиде или как в первом, так и во втором; и

В) выбор из библиотеки элемента, который проявляет пониженную аффинность к когнатному ко-иммуномодулирующему полипептиду.

ФИГ. 1



ФИГУРА 2А

GenBank 3S7G

Homo sapiens IgG1 Fc (SEQ ID NO:204)

227 ак

```
1 dkthtcppcp apellggpsv flfppkpkt lmisrtpevt cvvvdvshed pevknwyvd
61 gvevhnakk preeqynsty rvsvltvlh qdwlngkeyk ckvsnkappa piektiskak
121 gqprepqvyt lppsrdeitk nqvsitclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds
181 dgsfflyskl tvdkrwwgg nvfscsvmhe alnhytqks lslspgk
```

GenBank AAN76044

Homo sapiens IgG2 Fc (аминокислоты 99-325) (SEQ ID NO:205)

227 ак

```
1 stkgpsvfpl apcsrsts taalgclvkd yfpepvtvsw nsgaltsgvh tfpavlqssg
61 lyslssvvtv pssnfgtqty tcnvdhkpsn tkvdktverk ccvecppcpa ppvagpsvfl
121 fppkpkdtlm isrtpevtcv vdvshedpe vqfnwyvdgv evhnakkpr eeqfnstfrv
181 vsvltvvhqd wlngkeykck vsnkglpapi ektisktkgg prepqvytlp psreemtknq
241 vsitclvkqf ypsdiavewe sngqpennyk ttpmldsdg sfflyskltv dksrwqggv
301 fscsvmheal hnhytqksls lspgk
```

GenBank AAW65947

Homo sapiens IgG3 Fc (аминокислоты 19-246) (SEQ ID NO:206)

238 ак

```
1 hkpsntkvdk rvelktpigd tthtcppcpa pellggpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc
61 vvvdvshedp evknwyvdg vevhnaktkp reeqynstyr vsvltvlhq dwlngkeykc
121 kvsnkappa iektiskakg qprepqvytl ppsrdeltn qvsitclvkf fypsdiavew
181 esngqpenny kttppvldsd gsfflysklt vdkrwwqgn vfscsvmhea lnhytqksl
241 slspgk
```

ФИГУРА 2В

GenBank AAA52770

Homo sapiens IgD Fc (аминокислоты 162-383) (SEQ ID NO:207)

222 ак

```
1 ptkapdvfpi isgcrhpkdn spvvlacilit gyhptsvtvt wymgtqsqpq rtfpeiqrnd
61 syymtssqls tplqqwrqge ykcvvqhtas kskkeifrwp espkaqassv ptaqpqaegs
121 lakattapat trntgrggee kkkekekeeq eeretktpec pshtqplgvy lltpavqdlw
181 lrdkatftcf vvgSDLkdah ltwevagkvp tggveeglle rhsngsqsqh srllprslw
241 nagtsvtctl nhpslppqrl malrepaaqa pvklslnlla ssdppeaasw llcevsgfsp
301 pnillmwled qrevntsgfa parppppqprs ttfwawsvlr vpappspqpa tytcvvhed
361 srlllnasrs levsyvtDhg pmk
```

GenBank 0308221A

Homo sapiens IgM Fc (SEQ ID NO:208)

276 ак

```
1 vtstltikzs dwlgesmftc rvdhrglftq qnassmcvdpd qdtairvfai ppsfasiflt
61 kstklitclvt dlitybsvti swtreengav khthnishes pnatfsavge asicedbdws
121 gerftctvth tdlpsplkqt isrpkgvalh rpbvyllppa rzzlnlresa titclvtgfs
181 padvfvewmq rgeplspqky vtsapmpepq apgryfahsi ltvseeewnt ggtytcvvhah
241 ealpnrvter tvdkstgkpt lynvslvmsd tagtcy
```

ФИГУРА 2С

GenBank P01876

Homo sapiens IgA Fc (аминокислоты 120-353) (SEQ ID NO:209)

234 ак

```
1 asptspkvfp lslcstqpdg nvviaclvqg ffpqeplsvt wsesggqvta rnfppsqqdas
61 gdlyttssql tlpatqclag ksvtchvkhy tnpsqdvtp cpvpstpptp spstpptpsp
121 scchprlsh rpaledlllg seanltctlt glrdasgvtf twtpssgksa vqgpperdlc
181 gcysvssvlp gcaepwnhgk tftctaaype sktpltatls ksgntfrpev hllpppseel
241 alnelvtltc largfspkdv lvrwlqgsqe lprekyltwa srqepsqgtt tfavtsilrv
301 aaedwkkgdt fscmvgheal plaftqktid rlagkpthvn vsvwmaevdg tcy
```

GenBank 1F6A_B

Homo sapiens IgE Fc (аминокислоты 6-222) (SEQ ID NO:210)

212 ак

```
1 adpcdsnprg vsaylsrsp fdlfirkspt itclvvdlap skgtvnltws rasgkpvnhs
61 trkeekqrng tltvtstlpv gtrdwieget yqcrvthphl pralmrsttk tsgpraapev
121 yafatpewpg srdkrtlacl iqnmpedis vqwlhnevql pdarhsttqp rktkgsqffv
181 fsrlevtrae weqkdeficr avheaaspsq tvqravsvnp gk
```

GenBank P01861

Homo sapiens IgG4 Fc (аминокислоты 100-327) (SEQ ID NO:211)

228 ак

```
1 astkgpsvfp lapcsrstse staaigclvk dyfpepvtvs wnsgaltsgv htfpavllqss
61 glyslssvvt vpssslgtkt ytcnvdkhps ntkvdkrves kygpccpccp apelfggpsv
121 flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvsqed pevqfnwyvd gvevhnaktk preeqfnsty
181 rvvsvltvlh qdwlngkeyk ckvsnkgpls siektiskak gqprepqvyt lppsqeemtk
241 nqvsitclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds dgsfflysrl tvdksrwqeg
301 nvfscsvmhe alhnhytqks lslslgk
```

ФИГ. 2D

Последовательность Fc IgG1 человека ДТ: (SEQ ID NO:212)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФИГ. 2E

Мутантный Fc IgG1 человека: L234F/L235E/P331S (тройной мутант «ТМ») (SEQ ID NO:213)

DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФИГ. 2F

Мутантный Fc IgG1 человека: N297A (SEQ ID NO:214)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФИГ. 2G

Мутантный Fc IgG1 человека: L234A/L235A ("LALA") (SEQ ID NO:215)

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Остаток пронумерован в соответствии с индексом ЕС (нумерация Рабат)

ФИГУРА 3А

Homo sapiens

GenBank NP_001229687

HLA-A

АМИНОКИСЛОТЫ 25-365 (SEQ ID NO:216)

```
1 mavmaprtll lllsqalalt qtwagshsmr yfftsvsrpg rgeprfiavg yvddtqfvrf
61 dsdaasqkme prapwiegeg peywdqetrn mkahsqtdra nlgtlrgyyn qsedgshtiq
121 imygcdvqpd grflrgyrqd aydgkdyial nedlrswtaa dmaaqitkrk weavhaaeqr
181 rvylegrcvd glrrylengk etlqrtddpk thmthhpisd heatlrcwal gfypaeitlt
241 wqrdgedqtq dtelvetrpa gdgtfqkwa vvvpsgeeqr ytchvqhegl pkpltlrwel
301 ssqptipivg iiaglvllga vitgavvaav mwrrkssdrk ggsytqaass dsaggsdvs1
361 tackv
```

ФИГУРА 3В

Homo sapiens

GenBank NP_005505

HLA-B

АМИНОКИСЛОТЫ 25-362 (SEQ ID NO:217)

```
1 mlvmaprtvl lllsaalalt etwagshsmr yfytsvsrpg rgeprfisvg yvddtqfvrf
61 dsdaaspree prapwiegeg peywdrntqi ykaqaqtdre slrnlrgyyn qseagshtlq
121 smygcdvqpd grllrghdqy aydgkdyial nedlrswtaa dtaaaitqrk weaareaeqr
181 raylegecve wlrrylengk dkleradppk thvthhpisd heatlrcwal gfypaeitlt
241 wqrdgedqtq dtelvetrpa gdrtfkwaa vvvpsgeeqr ytchvqhegl pkpltlrwep
301 ssqstvipvg ivaglavlav vvigavvaav mcrrkssggk ggsysqaacs dsaggsdvs1
361 ta
```

ФИГУРА 3С

Homo sapiens

GenBank NP_001229971

HLA-C

АМИНОКИСЛОТЫ 25-366 (SEQ ID NO:218)

```
1 mrvmaprall lllsgglalt etwacshsmr yfdtavsrpg rgeprfisvg yvddtqfvrf
61 dsdaasprge prapwveqeg peywdretqn ykrqagadv slrnlrqyyn qsedgshtlq
121 rmygcdlgpd grllrgydqs aydgkdyial nedlrswtaa dtaaaitqrk leaaraaeql
181 raylegtcve wlrrylengk etlqraeppk thvthhplsd heatlrcwal gfypaeitlt
241 wgrdgedqtg dtelvetrpa gdgtfkwaa vvvpsgqeqr ytchmqhegl qepltswep
301 ssqptipimg ivaglavlvv lavlgavvta mmcrkssgg kggscsqaac snsaggsdes
361 litcka
```

ФНГ. 4

NP_004039.1 msrsvalavlallslsogleaiqrtpkiqvysrhpaengksnflncyvsgfhpsdievdll 60
NP_001009066.1 msrsvalavlallslsogleaiqrtpkiqvysrhpaengksnflncyvsgfhpsdievdll 60
NP_001040602.1 msrsvalavlallslsogleaiqrtpkiqvysrhppengkpnlncyvsgfhpsdievdll 60
NP_776318.1 marfvalvllgllslsgldaiqrppkiqvysrhppedgkpnynlncyvygfhppqieidl 60
NP_033865.2 marsvtlvflvlvsltglyaiqktpqiqvysrhppengkpnlnlncyvtqfhpphieiqml 60
: *:*,.* *:**,** ***,*:***** *:** * ***** ***,**::*

NP_004039.1 kngeriekvehsdlsfskdwsfylllyteftptekdeyacrnhvtlsqpkivkwdrdm 119 (SEQ ID NO:49)
NP_001009066.1 kngeriekvehsdlsfskdwsfylllyteftptekdeyacrnhvtlsqpkivkwdrdm 119 (SEQ ID NO:49)
NP_001040602.1 kngekmgkvehsdlsfskdwsfylllyteftptekdeyacrnhvtlsqprtkwdrdm 119 (SEQ ID NO:50)
NP_776318.1 kngekik-seqsdlfskdwsfyllshaeftpnskdqyscrvkhvtlegprivkwdrdl 118 (SEQ ID NO:51)
NP033865 kngkkipkvemsdmsfskdwsfyilahteftptetdyacrkvhasmaepktvywdrdm 119 (SEQ ID NO:52)
::: * **:**:* ;:*****.* *:***:*.:: * : * *****:

ФНГ. 5A*HLA-A*

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQE
 GREYWDGETRKVK AHSQTHRVDLGTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS
 WRFLRGYHQYAYDGKDYLKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLR
 AYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFP
 AEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVVPSGQEQRYTCHVQH
 EGLPKPLTLR WEP (SEQ ID NO:53)

ФНГ. 5B*HLA-A (Y84A; A236C)*

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQE
 GREYWDGETRKVK AHSQTHRVDLGTLRGA^YYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS
 WRFLRGYHQYAYDGKDYLKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLR
 AYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFP
 AEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPC^GDGT FQKWA AVVVPSGQEQRYTCHVQH
 EGLPKPLTLR WEP (SEQ ID NO:225)

ФНГ. 5C*HLA-A (Y84C; A139C)*

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQE
 GREYWDGETRKVK AHSQTHRVDLGTLRGC^YYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS
 WRFLRGYHQYAYDGKDYLKEDLRSWTAADM^CAQTTKHKWEAAHVAEQLR
 AYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFP
 AEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVVPSGQEQRYTCHVQH
 EGLPKPLTLR WEP (SEQ ID NO:226)

ФНГ. 5D***HLA-A A11***

GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRIA VGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQ
EGPEYWDQETRNVKAQSQTDRVDLGTLRGYYNQSEDGSHTIQIMYGCDVGPDG
RFLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHAAEQRAY
LEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEI
TLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEG
LPKPLTLRWE (SEQ ID NO:227)

ФНГ. 5E***HLA-A A11 (Y84A; A236C)***

GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRIA VGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQ
EGPEYWDQETRNVKAQSQTDRVDLGTLRGAYNQSEDGSHTIQIMYGCDVGPDG
RFLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHAAEQRAY
LEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEI
TLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEG
LPKPLTLRWE (SEQ ID NO:228)

ФНГ. 5F***HLA-B***

GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFISVGYVDDTQFVRFSDAASPREEPRAPWIEQE
GPEYWDRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQSMYGCDVGPDGR
LLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRRAYLE
GECVEWLRRYLENGKDKLERADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITL
TWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDRTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLP
KPLTLRWEP (SEQ ID NO:229)

ФНГ. 5G***HLA-B (Y84A; A236C)***

GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFISVGYVDDTQFVRFSDAASPREEPRAPWIEQE
GPEYWDRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGA^AYNQSEAGSHTLQSMYGCDVGPDGR
LLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRRAYLE
GECVEWLRRYLENGKDKLERADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITL
TWQRDGEDQTQDTEL VETRP^CGDRTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLP
KPLTLRWEP (SEQ ID NO:230)

ФНГ. 5H***HLA-B (Y84C; A139C)***

GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFISVGYVDDTQFVRFSDAASPREEPRAPWIEQE
GPEYWDRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGC^CYNQSEAGSHTLQSMYGCDVGPDGR
LLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADT^CAQITQRKWEAAREAEQRRAYLE
GECVEWLRRYLENGKDKLERADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITL
TWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDRTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLP
KPLTLRWEP (SEQ ID NO:231)

ФНГ. 5I***HLA-C***

CSHSMRYFDTA VSRPGRGEP RFISVGYVDDTQFVRFDS DAASPRGEP RAPWVEQ
EGPEYWDRETQ NYKRQAQADR VSLRNLRGYYNQSE DGSHTLQ RMYGCDLGPD
GRLLRGYDQSA YDGKDYIALNED LRSWTAADTAAQITQRKLEA ARAAEQLRAY
LEGTCVEWLRRY LENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWALGFYP AEI
TLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVVPSGQEQR YTCHMQHEG
LQEPLTLSWEP (SEQ ID NO:232)

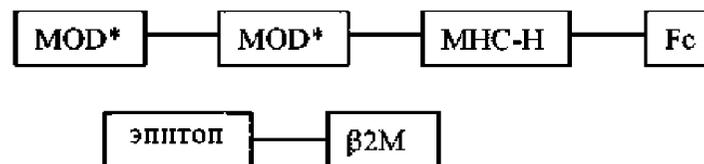
ФНГ. 5J***HLA-C (Y84A; A236C)***

CSHSMRYFDTA VSRPGRGEP RFISVGYVDDTQFVRFDS DAASPRGEP RAPWVEQ
EGPEYWDRETQ NYKRQAQADR VSLRNLRGA YNQSE DGSHTLQ RMYGCDLGPD
GRLLRGYDQSA YDGKDYIALNED LRSWTAADTAAQITQRKLEA ARAAEQLRAY
LEGTCVEWLRRY LENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWALGFYP AEI
TLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPCGDGT FQKWA AVVVPSGQEQR YTCHMQHEG
LQEPLTLSWEP (SEQ ID NO:233)

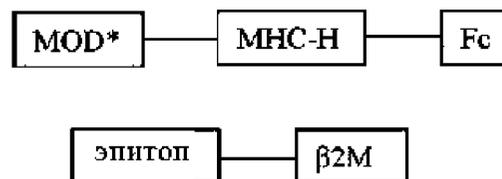
ФНГ. 5K***HLA-C (Y84C; A139C)***

CSHSMRYFDTA VSRPGRGEP RFISVGYVDDTQFVRFDS DAASPRGEP RAPWVEQ
EGPEYWDRETQ NYKRQAQADR VSLRNLRGC YNQSE DGSHTLQ RMYGCDLGPD
GRLLRGYDQSA YDGKDYIALNED LRSWTAADTCAQITQRKLEA ARAAEQLRAY
LEGTCVEWLRRY LENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWALGFYP AEI
TLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVVPSGQEQR YTCHMQHEG
LQEPLTLSWEP (SEQ ID NO:234)

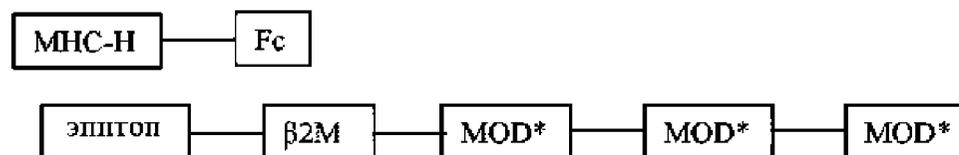
ФИГ. 6А



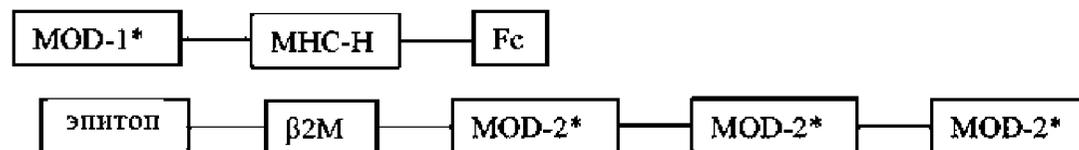
ФИГ. 6В



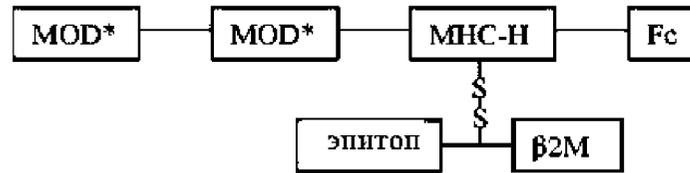
ФИГ. 6С



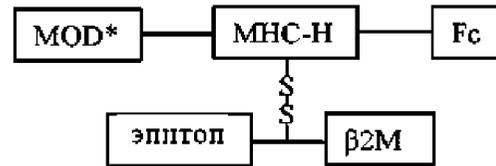
ФИГ. 6D



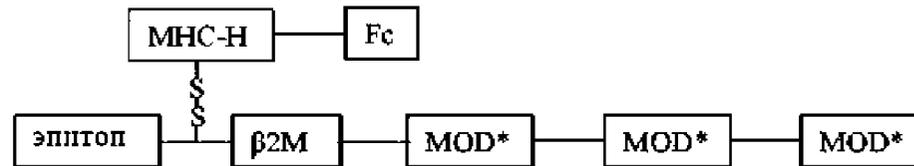
ФИГ. 7А



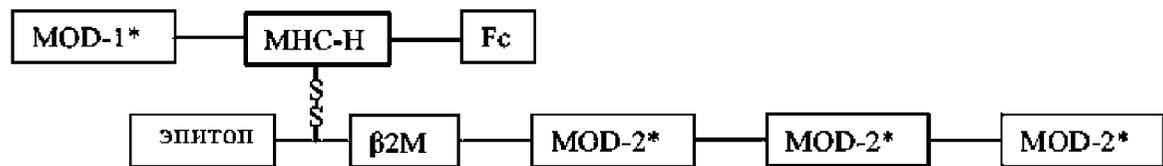
ФИГ. 7В



ФИГ. 7С



ФИГ. 7D



Фиг. 8

HLA-A GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMFPAPWIEQEGPEYW
 HLA-B GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFRFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPREEPAPWIEQEGPEYW
 HLA-C CSHSMRYFDTAVSRPGRGEPFRFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPRGEPAPWVEQEGPEYW
 HLA-A*0201 GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMFPAPWIEQEGPEYW
 H2K мыши GPHSLRYFVTAVSRPGLGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFDSADNPRFEPAPWMEQEGPEYW
 HLA_A(вар. 2) GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMFPAPWIEQEGPEYW
 HLA_A(вар. 2C) GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMFPAPWIEQEGPEYW
 HLA-A(вар. 2CP) GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMFPAPWIEQEGPEYW
 HLA-A*1101 GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMFPAPWIEQEGPEYW
 HLA-A*2402 GSHSMRYFSTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMFPAPWIEQEGPEYW
 HLA-A*3303 GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMFPAPWIEQEGPEYW
 ::* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:*

84

HLA-A DQETRNKKAHSQTDRLNLSLTLRGYINQSEAGSHTIQIMYGCDVGPDRFLRGYRQDAYDG
 HLA-B DRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGYINQSEAGSHTLQSMYGC DVGPDGRLLRGHDQYAYDG
 HLA-C DRETQMYKRAQAQADRVSLRNLRGYINQSEAGSHTLQRMYGCDLGPDRLLRGYDQSAAYDG
 HLA-A*0201 DGETRNVKAHSQTHRVDLSTLRGYINQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFRLRGYHQYAYDG
 H2K мыши EEQTQRAKSDQWFRVSLRTAQRYYNQSKGSGHTFQRMFGCDVGS DWRLLRGYQQFAYDG
 HLA_A(вар. 2) DGETRNVKAHSQTHRVDLSTLRGYINQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFRLRGYHQYAYDG
 HLA_A(вар. 2C) DGETRNVKAHSQTHRVDLSTLRGYINQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFRLRGYHQYAYDG
 HLA_A(вар. 2CP) DGETRNVKAHSQTHRVDLSTLRGYINQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFRLRGYHQYAYDG
 HLA-A*1101 DQETRNVKAQSQTDRLVLSLTLRGYINQSEAGSHTIQIMYGCDVGPDRFLRGYRQDAYDG
 HLA-A*2402 DEETGKVKKAHSQTDRENLRALRYINQSEAGSHTLQMMFGCDVGS DGRFLRGYHQYAYDG
 HLA-A*3303 DRNTRNVKAHSQIDRVLDLSTLRGYINQSEAGSHTIQMNYGCDVGS DGRFLRGYQQDAYDG
 : : * * . * * * . * * * * : * * * * : * * * * . * * * * : * * * * : * * * *
 aac1 aac2

139

HLA-A KDYIALNEDLRSWTAADMFAQITKRWKWEAAHVAEQRRVYLEGRCVDGLRRYLENGKETLQ
 HLA-B KDYIALNEDLRSWTAADTFAQITQKWEAAREAEQRRAYLEGECCVEWLRRYLENGKDKLE
 HLA-C KDYIALNEDLRSWTAADTFAQITQKWEAAREAEQRRAYLEGECCVEWLRRYLENGKETLQ
 HLA-A*0201 KDYIALKEDLRSWTAADMFAQITTKHWEEAAHVAEQRLRAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQ
 H2K мыши RDYIALNEDLRTWTAADTFAALITKWEQAAGDAEYRAYLEGECCVEWLRRYLELGNETLL
 HLA_A(вар. 2) KDYIALKEDLRSWTAADMFAQITTKHWEEAAHVAEQRLRAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQ
 HLA_A(вар. 2C) KDYIALKEDLRSWTAADMFAQITTKHWEEAAHVAEQRLRAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQ
 HLA_A(вар. 2CP) KDYIALKEDLRSWTAADMFAQITTKHWEEAAHVAEQRLRAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQ
 HLA-A 1101 KDYIALNEDLRSWTAADMFAQITKRWKWEAAHVAEQRRAYLEGRCVEWLRRYLENGKETLQ
 HLA-A*2402 KDYIALKEDLRSWTAADMFAQITKRWKWEAAHVAEQRRAYLEGTCEVDGLRRYLENGKETLQ
 HLA-A*3303 KDYIALNEDLRSWTAADMFAQITQKWEAARVAEQRLRAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQ
 : * * * * : * * * * : * * * * . * * * * . * * * * . * * * * . * * * * . * * * *
 aac3 aac4

Фиг. 8 (продолжение)

236

HLA-A	RTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGT
HLA-B	RADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDRTE
HLA-C	RAEPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGT
HLA-A*0201	RTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGT
H2K мыши	RTDSPKAHVTYHPRSQVDVTLRCWALGFYPADITLTWQLNGEDLTQDMEL	VETRPAGDGT
HLA_A (вар. 2)	RTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGT
HLA_A (вар. 2C)	RTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGT
HLA-A (вар. 2CP)	RTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGT
HLA-A*1101	RTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGT
HLA-A*2402	RTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGT
HLA-A*3303	RTDPPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGT
	*:: **::**::* *:: :.*****.*****:***** :*** ** *	***** ** **

aac5. aac6

HLA-A	QKWAAVVVP	SGGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE	(SEQ ID NO:242)	
HLA-B	QKWAAVVVP	SGGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE	(SEQ ID NO:243)	
HLA-C	QKWAAVVVP	SGQEQR	YTCM	QHEGLQEPLTLSWE (SEQ ID NO:244)
HLA-A*0201	QKWAAVVVP	SGQEQR	YTCV	QHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID NO:53)
H2K мыши	QKWAAVVVP	PLGKEQNYTCHVHKKGLPEPLTLRW	(SEQ ID NO:54)	
HLA_A (вар. 2)	QKWAAVVVP	SGQEQR	YTCV	QHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:245)
HLA_A (вар. 2C)	QKWAAVVVP	SGQEQR	YTCV	QHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:246)
HLA-A (вар. 2CP)	QKWAAVVVP	SGQEQR	YTCV	QHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID NO:247)
HLA-A*1101	QKWAAVVVP	SGGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEL	(SEQ ID NO:248)	
HLA-A*2402	QKWAAVVVP	SGGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEP	(SEQ ID NO:249)	
HLA-A*3303	QKWAASVVVP	SGQEQR	YTCV	QHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID NO:250)
	****:**** *	**::**::*****:;:** * :**** *		