

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092316 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.05.25

(22) Дата подачи заявки
2019.03.27

(51) Int. Cl. C07K 14/55 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2/АЛЬФА-РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/649,379

(32) 2018.03.28

(33) US

(86) PCT/US2019/024376

(87) WO 2019/191295 2019.10.03

(71) Заявитель:
БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Стратерс Мэри, Дэвис Джонатан
Гарри, Дойл Майкл Луис, Мадиа
Прианка Апурва (US)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллина Е.М. (RU)

(57) В настоящем документе раскрыты слитые белки, содержащие (а) первый полипептид, содержащий интерлейкин-2 (IL2); и (b) второй полипептид, слитый в рамке с первым полипептидом, причем второй полипептид содержит внеклеточный домен из альфа-рецептора интерлейкина-2 (IL2R α), причем IL2 или IL2R α содержит по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с природным IL2 или природным IL2R α . Также раскрыты способы получения и способы терапевтического применения таких слитых белков.

A1

202092316

202092316

A1

СЛИТЫЕ БЕЛКИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2/АЛЬФА-РЕЦЕПТОРА

ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

ОПИСАНИЕ

1. Ссылки на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/649379, поданной 28 марта 2018 года, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

2. Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде через Efs-Web

[0002] Содержание перечня последовательностей, представленного в электронном виде в текстовом файле в формате ASCII (имя: 3338_100PC01_Seqlisting_ST25.txt; размер: 354542 байта; и дата создания: 27 марта 2019 года), поданного вместе с заявкой, включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

3. Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0003] Настоящим раскрываемый предмет изобретения в целом относится к способам и композициям для модулирования иммунного ответа с использованием слитого белка интерлейкина-2/альфа-рецептора интерлейкина-2.

4. Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0004] Интерлейкин-2 (IL2 или IL-2) является биологическим цитокином, который регулирует ключевые аспекты иммунной системы. IL2 применяют в попытках усилить иммунные ответы у пациентов с раком, воспалительным заболеванием или аутоиммунным заболеванием. IL2 является высокоэффективным фактором роста Т-клеток, который стимулирует иммунные ответы, в том числе клональное размножение активированных антигеном Т-клеток, запускает развитие CD4⁺ Т-хелперов (Th)1 и Th2-клеток, запускает окончательную дифференцировку CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и

противодействует развитию CD4+ Th17 и Т-фолликулярных хелперных (Tfh) клеток. IL2 также участвует в формировании Т-клеточных ответов на основе мнемонического воспроизведения.

[0005] В клинических испытаниях для стимуляции Т- и NK-клеток задействуют активирующие Т-клетки свойства IL2 на пациентах с раком и ВИЧ/СПИДом путем инфузии высоких доз IL2 (обычно > 500000 единиц/кг, многократно). Действительно, IL2 был одобрен FDA для применения на пациентах с меланомой и почечно-клеточной карциномой, поскольку у некоторых (примерно 5%) пациентов наблюдалась полная ремиссия. Тем не менее, частота ответа была низкой при этих и других формах рака, в то же время данная терапия сопровождалась тяжелой токсичностью. В то же время считалось, что IL2 не эффективен для стимуляции иммунитета у пациентов с ВИЧ/СПИДом. Низкая эффективность высоких доз IL2 в этих условиях отчасти объясняется сопутствующим увеличением количества клеток Treg.

[0006] Совсем недавно были использованы более низкие дозы IL2 для избирательной стимуляции переносимости с целью подавления нежелательных иммунных ответов, связанных с аутоиммуноподобной атакой на собственные ткани. При таких низких дозах IL2 не наблюдали никаких признаков усиления или повторной активации аутореактивных Т-клеток. Из результатов доклинических исследований было видно, что низкий уровень передачи сигналов с участием IL2R избирательно стимулирует ключевые активности Treg, но не эффекторных Т-клеток (Teff), и что при обработке мышей низким уровнем IL2 предотвращалось развитие аутоиммунной реакции. В настоящее время ряд пациентов с гиперактивным иммунным ответом получают лечение низкими дозами IL2 (0,5-2 миллиона единиц, периодически). На данный момент из опыта видно, что такая терапия безопасна, не имеет признаков повторной активации аутоагрессивных Т-клеток, в то же время почти у всех пациентов возрастает количество клеток Treg, что зачастую сопровождается клиническим улучшением. Тем не менее, IL2 как терапевтическое средство имеет важные недостатки, в том числе очень короткий период полужизни *in vivo*, что ограничивает его эффективность, и токсичность при высоких дозах. По этим причинам для применения необходимы новые биопрепараты IL2 с улучшенной фармакокинетикой и продолжительностью ответов.

5. Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0007] Настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему (а) первый полипептид, содержащий полипептид интерлейкина-2 (IL2); и (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен полипептида альфа-рецептора интерлейкина-2 (IL2R α);

причем (i) у внеклеточного домена полипептида IL2R α по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с внеклеточным доменом природного IL2R α (SEQ ID NO:7); и/или (ii) у полипептида IL2 по меньшей мере на один сайт гликозилирования по сравнению с природным IL2 (SEQ ID NO:2); и причем слитый белок обладает активностью IL2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, у внеклеточного домена полипептида IL2R α по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше, по меньшей мере на два сайта гликозилирования меньше, по меньшей мере на три сайта гликозилирования меньше, по меньшей мере на четыре сайта гликозилирования меньше, по меньшей мере на пять сайтов гликозилирования меньше, по меньшей мере на шесть сайтов гликозилирования меньше, по меньшей мере на семь сайтов гликозилирования меньше, по меньшей мере на восемь сайтов гликозилирования меньше или по меньшей мере на девять сайтов гликозилирования меньше по сравнению с внеклеточным доменом природного IL2R α (SEQ ID NO:7). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, у полипептида IL2 по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с природным IL2 (SEQ ID NO:2).

[0008] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок содержит первый полипептид, причем первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную последовательности под SEQ ID NO:2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок содержит второй полипептид, причем второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную последовательности под SEQ ID NO:12.

[0009] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, внеклеточный домен полипептида IL2R α , у которого по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше, содержит мутацию, которая удаляет сайт гликозилирования. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация удаляет сайт О-гликозилирования и/или сайт N-гликозилирования. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация удаляет сайт О-гликозилирования. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация удаляет сайт N-гликозилирования.

[0010] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация во внеклеточном домене полипептида IL2R α представляет собой делецию аминокислот 167-219, аминокислот 168-219, аминокислот 169-219, аминокислот 170-219, аминокислот 171-219, аминокислот 172-219, аминокислот 173-219, аминокислот 174-219, аминокислот 175-219, аминокислот 176-219, аминокислот 177-219, аминокислот 178-219, аминокислот 179-219, аминокислот 180-219, аминокислот 181-219, аминокислот 182-219, аминокислот 183-219, аминокислот 184-219, аминокислот 185-219, аминокислот 186-219, аминокислот 187-219, аминокислот 188-219, аминокислот 189-219, аминокислот 190-219, аминокислот 191-219 или аминокислот 192-219, соответствующих последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация представляет собой делецию аминокислот от 167, 169, 171 до 192-219 включительно, соответствующих последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация не включает делецию 170-219, соответствующих последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второй полипептид представлен последовательностью под SEQ ID NO:11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второй полипептид представлен последовательностью под SEQ ID NO:12.

[0011] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты, которая гликозилирована, на аминокислоту, которая не гликозилирована. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты, которая обеспечивает возможность гликозилирования на соседней аминокислоте, на аминокислоту, которая не обеспечивает возможность гликозилирования на соседней аминокислоте. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен приходится на аминокислоту N49, аминокислоту N68, аминокислоту T74, аминокислоту T85, аминокислоту T197, аминокислоту T203, аминокислоту T208 и аминокислоту T216 или любую их

комбинацию, причем расположения аминокислот соответствуют последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с аспарагина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с треонина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[0012] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту N49. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, N49 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

[0013] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту N68. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, N68 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

[0014] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту T74. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, T74 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[0015] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту T85. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, T85 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина,

аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[0016] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту T197. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, T197 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[0017] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту T203. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, T203 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[0018] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту T208. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, T208 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[0019] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту T216. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, T216 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[0020] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен приходятся на аминокислоту S50, аминокислоту S51, аминокислоту T69, аминокислоту T70, аминокислоту C192 или любую их комбинацию, причем расположения аминокислот соответствуют последовательности под SEQ ID NO:7.

[0021] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту S50. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, S50 мутирована в пролин.

[0022] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту S51. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, S51 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[0023] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту T69. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, T69 мутирована в пролин.

[0024] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту T70. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, T70 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

[0025] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту C192. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, C192 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

[0026] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полипептид IL2, у которого по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше, содержит мутацию, которая удаляет сайт гликозилирования. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты, которая гликозилирована, на аминокислоту, которая не гликозилирована. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты, которая обеспечивает возможность гликозилирования на соседней аминокислоте, на аминокислоту, которая не обеспечивает возможность гликозилирования на

соседней аминокислоте. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с аланина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с треонина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с цистеина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с цистеина на серин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с цистеина на аланин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с цистеина на валин.

[0027] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен приходится на аминокислоту T3 относительно соответствующей последовательности под SEQ ID NO:2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту C125. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена по аминокислоте C125 выбрана из группы, состоящей из C125S, C125A и C125V.

[0028] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация представляет собой делецию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, делеция приходится на аминокислоту A1.

[0029] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок дегликозилирован ферментативным или химическим путем. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок дегликозилирован с помощью щелочи, гидразиолиза, ПНГазы F, эндо-Н, О-гликозидазы или любой их комбинации.

[0030] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок дополнительно содержит линкер, слитый в рамке между первым полипептидом и вторым полипептидом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, линкер представляет собой глицин/сериновый линкер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, глицин/сериновый линкер содержит аминокислотную последовательность $(GS)_n$, $(GGS)_n$, $(GGGS)_n$, $(GGGGS)_n$ или $(GGGGGS)_n$, где n представляет собой целое число 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, глицин/сериновый линкер содержит аминокислотную последовательность $(GGGS)_3$.

[0031] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок дополнительно содержит гетерологичный фрагмент, слитый с первым полипептидом и/или вторым полипептидом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, увеличивающий период полужизни. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент содержит неполипептидный фрагмент. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичная фрагмент содержит полипептид. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент содержит альбумин, иммуноглобулиновый константный участок или его часть, связывающий иммуноглобулин полипептид, иммуноглобулин G (IgG), связывающий альбумин полипептид (ABP), фрагмент для ПАСилирования, фрагмент для ГЭЖилирования, XTEN, фрагмент для ПЭЖилирования, Fc-участок и любую их комбинацию.

[0032] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок является более стабильным, чем полипептид, состоящий из последовательности под SEQ ID NO:2 или последовательности под SEQ ID NO:13. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок обладает одним или несколькими свойствами, выбранными из группы, состоящей из (i) повышенной термодинамической стабильности по сравнению с эталонным белком; (ii) повышенной ТМ по сравнению с эталонным белком; (iii) повышенной устойчивости к разрушению по сравнению с эталонным белком; (iv) повышенной устойчивости к модификациям по сравнению с эталонным белком; (v) повышенной стабильности *in vivo* по сравнению с эталонным белком; и (vi) любой их комбинации, причем эталонный белок содержит (i) первый полипептид, содержащий полипептид интерлейкина-2 (IL2); и (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен из полипептида альфа-

рецептора интерлейкина-2 (IL2R α); и имеет по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с слитым белком.

[0033] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок представляет собой мономер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок представляет собой димер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, димер содержит два мономера, а мономеры связаны друг с другом ковалентными связями. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, димер содержит два мономера, а мономеры связаны нековалентными связями.

[0034] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок обладает одним или несколькими фармакокинетическими свойствами, выбранными из группы, состоящей из увеличенного периода полужизни, повышенной C_{max} , увеличенной AUC, повышенной C_{min} , пониженного клиренса, улучшенной биодоступности и любой их комбинации, по сравнению с фармакокинетическим свойством полипептида, состоящего из последовательности под SEQ ID NO:2 или последовательности под SEQ ID NO:13. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок обладает удлинённым периодом полужизни. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, удлинённый период полужизни по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 6 раз, по меньшей мере приблизительно в 7 раз, по меньшей мере приблизительно в 8 раз, по меньшей мере приблизительно в 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по меньшей мере приблизительно в 11 раз, по меньшей мере приблизительно в 12 раз, по меньшей мере приблизительно в 13 раз, по меньшей мере приблизительно в 14 раз, по меньшей мере приблизительно в 15 раз, по меньшей мере приблизительно в 16 раз, по меньшей мере приблизительно в 17 раз, по меньшей мере приблизительно в 18 раз, по меньшей мере приблизительно в 19 раз, по меньшей мере приблизительно в 20 раз, по меньшей мере приблизительно в 21 раз или по меньшей мере приблизительно в 22 раз больше по сравнению с периодом полужизни полипептида, состоящего из последовательности под SEQ ID NO:2 или последовательности под SEQ ID NO:13.

[0035] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты один или несколько слитых белков. В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей один или несколько раскрытых в настоящем документе слитых белков.

[0036] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыта нуклеиновая кислота, которая кодирует любой из раскрытых в настоящем документе слитых белков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыт вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует любой из раскрытых в настоящем документе слитых белков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыта клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, которая кодирует любой из раскрытых в настоящем документе слитых белков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки насекомого, дрожжевой клетки, трансгенной клетки млекопитающего и клетки растения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, прокариотическая клетка представляет собой бактериальную клетку.

[0037] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (а) раскрываемый в настоящем документе слитый белок, раскрываемую в настоящем документе композицию, раскрываемую в настоящем документе нуклеиновую кислоту, раскрываемый в настоящем документе вектор или раскрываемую в настоящем документе клетку-хозяина; и (b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0038] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к набору, содержащему раскрываемый в настоящем документе белок слитый белок, раскрываемую в настоящем документе композицию, раскрываемую в настоящем документе нуклеиновую кислоту, раскрываемый в настоящем документе вектор или раскрываемую в настоящем документе клетку-хозяина и инструкции по введению слитого белка нуждающемуся в том субъекту.

[0039] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу получения раскрываемого в настоящем документе слитого белка, предусматривающему культивирование раскрываемой в настоящем документе клетки-

хозяина в подходящих условиях и выделение слитого белка. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку или прокариотическую клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, клетку насекомого, грибную клетку, клетку растения, трансгенную клетку млекопитающего или бактериальную клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из клетки CHO, клетки HEK 293, клетки NS0, клетки Per C6, клетки ВНК и клетки COS. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, бактериальная клетка представляет собой *Escherichia coli*.

[0040] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в том субъекта, предусматривающему введение субъекту эффективного количества раскрываемого в настоящем документе слитого белка, раскрываемой в настоящем документе композиции, раскрываемой в настоящем документе нуклеиновой кислоты, раскрываемого в настоящем документе вектора, раскрываемой в настоящем документе клетки-хозяина или раскрываемой в настоящем документе фармацевтической композиции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, заболевание или нарушение представляет собой рак. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки, карциному эндометрия, рак яичников, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак головы и шеи, рак легких, рак желудка, герминогенный рак, рак костей, плоскоклеточный рак, рак кожи, новообразование центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, саркому, рак вирусного происхождения, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, ходжкинскую или неходжкинскую лимфому, рак поджелудочной железы, глиобластому, глиому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, миелому, карциному слюнной железы, рак почек, базальноклеточную карциному, меланому, рак предстательной железы, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, рак яичка, рак пищевода или рак головы или шеи и любые их комбинации.

[0041] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, заболевание или нарушение представляет собой воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из сахарного диабета 1-го типа,

рассеянного склероза, ревматоидного артрита, глютеиновой болезни, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, кожной волчанки, ювенильного идиопатического артрита, болезни Крона, язвенного колита или склеродермии, болезни «трансплантат против хозяина», псориаза, очаговой алопеции, HCV-индуцированного васкулита, синдрома Шегрена, пузырчатки, анкилозирующего спондилоартрита, болезни Бехчета, гранулематоза Вегенера, синдрома Такаясу, аутоиммунного гепатита, склерозирующего холангита, синдрома Гужеро-Шегрена и активации макрофагов.

[0042] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, инфекционное заболевание обусловлено патогенным вирусом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, патогенный вирус выбран из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита А, вируса гепатита В, вируса гепатита С, вируса герпеса, аденовируса, вируса гриппа, флавивирусов, эховируса, риновируса, коксаки-вируса, коронавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса эпидемического паротита, ротавируса, вируса кори, вируса краснухи, парвовируса, вируса коревой оспы, Т-лимфотропного вируса человека (HTL), вируса денге, папилломавируса, вируса моллюска, полиовируса, вируса бешенства, вируса Джона Каннингема (JC вируса) и вируса арбовирусного энцефалита. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, инфекционное заболевание обусловлено патогенной бактерией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, патогенная бактерия выбрана из группы, состоящей из хламидии, риккетсиозной бактерии, микобактерии, стафилококков, стрептококков, пневмококков, менингококков и гонококков, клебсиеллы, протей, серратии, псевдомон, легионеллы, дифтерии, сальмонеллы, бацилл, холеры, столбняка, ботулизма, сибирской язвы, чумы, лептоспироза и бактерии, вызывающей болезнь Лайма. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, инфекционное заболевание обусловлено патогенными грибами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, патогенный гриб выбран из группы, состоящей из представителя рода *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т. д.), *Cryptococcus neoformans*, представителя рода *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т. д.), представителя рода *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, инфекционное заболевание обусловлено патогенным паразитом. В соответствии с некоторыми вариантами

осуществления, патогенный паразит выбран из группы, состоящей из *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba sp.*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium sp.*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* и *Nippostrongylus brasiliensis*.

[0043] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемые в настоящем документе способы дополнительно предусматривают введение субъекту второго средства. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе средство представляет собой антагонист PD-1, антагонист CTLA-4, антагонист TIM3, антагонист GITR, антагонист KIR, антагонист LAG3 или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе средство представляет собой антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к CTLA-4, антитело к TIM3, антитело к KIR, антитело к GITR, антитело к LAG3 или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе средство представляет собой ингибитор цитокинов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ингибитор цитокинов нацелен на одно или несколько из IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF, IFN- γ или любую их комбинацию.

[0044] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок вводят местно, через слизистую эпидермиса, интраназальным, пероральным, вагинальным, ректальным, подъязычным, местным, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным, внутриартериальным, внутриоболочечным, внутрилимфатическим, внутриочаговым, внутрикапсульным, внутриглазничным, внутрисердечным, внутридермальным, транстрахеальным, подкожным, внутрикожным, внутрисуставным, подкапсулярным, субарахноидальным, интраспинальным, эпидуральным или надчревным путем.

6. Краткое описание чертежей

[0045] На фиг. 1 видно, что молекулярная масса последовательности под SEQ ID NO:16 составляет 93 кДа по результатам измерения статического светорассеяния SEC/MALS. Теоретическая масса одной полипептидной цепи уменьшилась на 37812 Да. По наблюдаемой массе в растворе видно, что она существует в виде гомогенного гомодимера с массой приблизительно 19% из-за гликозилирования.

[0046] На фиг. 2 показано прототипное связывание слитого белка IL2-CD25 (SEQ ID NO:16) с sCD25 человека с использованием результатов измерений поверхностного плазмонного резонанса.

[0047] На фиг. 3 показаны графики зависимости концентрации в сыворотке от времени для указанных слитых белков у Balb/C мышей после введения однократной внутривенной (IV) или подкожной (SC) дозы 0,5 мг/кг. Каждый момент времени представляет собой среднее значение образцов, взятых от 3 мышей. Планками погрешностей представлено стандартное отклонение.

[0048] На фиг. 4 показаны графики зависимости концентрации в сыворотке от времени для указанных слитых белков у Balb/C мышей после введения однократной внутривенной (IV) или подкожной (SC) дозы 0,5 мг/кг. Каждый момент времени представляет собой среднее значение образцов, взятых от 3 мышей. Планками погрешностей представлено стандартное отклонение.

[0049] На фиг. 5 показаны графики зависимости концентрации в сыворотке от времени для hIL2-CD25 (22-212) у яванского макака после введения однократной подкожной (SC) дозы 0,075 мг/кг. Каждый момент времени представляет собой среднее значение образцов, взятых от 3 обезьян. Планками погрешностей представлено стандартное отклонение.

[0050] На фиг. 6 показана активность слитых белков IL2-CD25 в отношении индукции фосфорилирования STAT5 в PBMC человека от репрезентативного донора. Клетки гейтировали по Treg (CD4⁺, foxp3⁺, CD25⁺) или Tconv (CD4⁺, foxp3⁻), CD8⁺ и NK-клеткам (CD3⁻, CD56⁺) и рассчитывали процент клеток, которые после инкубации были положительно окрашены по pSTAT5. EC₅₀ для индукции pSTAT5 у Treg, определенная по результатам этих экспериментов, составляла 10 нг/мл, 4,4 нг/мл и 4,6 нг/мл соответственно для hIL2-CD25(22-240), hIL2-CD25(22-212) и hIL2-CD25(22-187).

[0051] На фиг. 7 показана способность укороченных слитых белков стимулировать IL2R в цельной крови, что приводит к индукции фосфорилированного STAT5 в клетках различного типа. Передачу сигналов с участием IL2R детектировали путем измерения с помощью проточной цитометрии после внутриклеточного окрашивания по pSTAT5 и определения процента клеток, окрашенных положительно по pSTAT5, в смеси цельной крови. У репрезентативного донора сравнивали действенность hIL2-CD25(22-240) с действенностью hIL2-CD25(22-212). Титровали белок в цельной крови человека и с помощью проточной цитометрии измеряли интенсивность внутриклеточного окрашивания по pSTAT5. EC₅₀ для индукции pSTAT5 у Treg составляла 22 нг/мл в случае hIL2-CD25(22-240) и 36 нг/мл в случае hIL2-CD25(22-212).

[0052] На фиг. 8А-8С показана схожая способность hIL2-CD25(22-240), hIL2-CD25(22-212) и hIL2-CD25(22-184) увеличивать количество Т-клеток у мышей с гуманизированной иммунной системой. Введение (SC) слитого белка мышам с привитым NSG-huCD34 производили раз в трое суток в течение трех доз. Анализ Treg (фиг. 8А), CD8 (фиг. 8В) и NK-клеток (фиг. 8С) из селезенки обрабатываемых мышей проводили с помощью проточной цитометрии.

[0053] На фиг. 9А и фиг. 9В показано фосфорилирование STAT5 через 15 минут в смешанной популяции клеток, в том числе у PBMC (фиг. 9А), или показана концентрация в цельной крови (фиг. 9В) с hIL2-CD25(22-212) (SEQ ID NO:16).

[0054] На фиг. 10 показаны результаты LC-MS/MS-анализа стабильности линкера (G3S)3 в IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212) в сыворотке крови человека или мыши в условиях *in vitro*. Приведено соотношение площадей пиков у IL2 и CD25, полученное с помощью LC-MS/MS, после захвата с помощью антитела к IL2.

[0055] На фиг. 11 показаны результаты LC-MS/MS-анализа стабильности линкера (G3S)3 в IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212) в сыворотке обезьян после однократной подкожной дозы 0,075 мг/кг. Приведено соотношение площадей пиков у IL2 и CD25, полученное с помощью LC-MS/MS, после захвата с помощью антитела к IL2.

7. Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0056] Далее в настоящем документе настоящее изобретение описано более подробно со ссылкой на прилагаемые графические материалы, на которых показаны некоторые, но не все варианты осуществления настоящего изобретения. В действительности же, настоящее изобретение можно осуществить во многих различных формах, и их не следует рассматривать как ограниченные вариантами осуществления, изложенными в настоящем документе; скорее, эти варианты осуществления представлены для того, чтобы настоящее изобретение удовлетворяло требованиям законодательства. Одинаковые номера относятся ко всем одинаковым элементам.

[0057] Специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение, благодаря преимуществам идей, представленных в предшествующем описании и связанных графических материалах, на ум придут многие модификации и другие варианты осуществления настоящего изобретения, которое изложено в настоящем документе. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не следует ограничивать конкретными

раскрытыми вариантами осуществления и что подразумевается, что модификации и другие варианты осуществления включены в объем прилагаемой формулы изобретения. Хотя в настоящем документе использованы конкретные термины, их применяют лишь в общем и описательном смысле, а не в целях ограничения.

7.1 Общий обзор

[0058] В настоящем документе представлены различные способы и композиции, которые можно использовать для модуляции иммунной системы. Композиции включают слитый белок, содержащий: (a) первый полипептид, содержащий полипептид интерлейкина-2 (IL2); и (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен полипептида альфа-рецептора интерлейкина-2 (IL2R α); причем (i) у внеклеточного домена полипептида IL2R α по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше, по сравнению с внеклеточным доменом природного IL2R α (SEQ ID NO:7); и/или (ii) у полипептида IL2 по меньшей мере на один сайт гликозилирования по сравнению с природным IL2 (SEQ ID NO:2); и причем слитый белок обладает активностью IL2.

[0059] Настоящее изобретение также относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей раскрываемый в настоящем документе слитый белок, к вектору, содержащему такую нуклеотидную последовательность, к клетке-хозяину, содержащей такую нуклеотидную последовательность, и к композиции, содержащей слитый белок, нуклеотидную последовательность, вектор или клетку-хозяина. Настоящее изобретение также относится к способам получения слитого белка, нуклеотидной последовательности, вектора, клетки-хозяина или композиции или к способам применения слитого белка, нуклеотидной последовательности, вектора, клетки-хозяина или композиции.

7.2 Определения

[0060] Следует отметить, что термины в форме единственного числа обозначают один или несколько таких объектов; например, термин «нуклеотидная последовательность» понимают как обозначающий одну или несколько нуклеотидных последовательностей. В силу этого, термины в форме единственного числа или в форме «один или несколько» и «по меньшей мере один» могут быть использованы в настоящем документе взаимозаменяемо.

[0061] Кроме того, «и/или» в контексте настоящего документа следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов друг с другом

или друг без друга. Таким образом, термин «и/или», применяемый в контексте такой фразы, как «А и/или В», в настоящем документе подразумевают как включающий «А и В», «А или В», «А» (только) и «В» (только). Аналогичным образом, термин «и/или», применяемый в такой фразе, как «А, В и/или С», подразумевают как охватывающий каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (только); В (только); и С (только).

[0062] Точно так же слово «или» подразумевают как включающее «и», если контекст явно не указывает на иное. Кроме того, следует понимать, что все размеры оснований или размеры аминокислот, а также все значения молекулярного веса или молекулярной массы, приведенные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются примерными и представлены в описательных целях.

[0063] Понятно, что везде, где аспекты в настоящем документе описаны формулировкой «содержащий», также предусмотрены аналогичные аспекты, описываемые выражением «состоящий из» и/или «фактически состоящий из».

[0064] Если не определено иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, в Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, для специалистов в настоящей области техники представлен общий словарь многих терминов, применяемых в настоящем раскрытии.

[0065] Единицы, приставки и символы обозначены в их принятой метрической системой единиц измерений (СИ) форме. Числовые диапазоны включают числа, определяющие такой диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записаны слева направо в ориентации от аминоконца к карбоксиконцу. Представленные в настоящем документе заголовки не являются ограничениями различных аспектов настоящего раскрытия, что можно понять посредством обращения к описанию в целом. Соответственно, термины, определение которым представлено непосредственно ниже, более полно определены с учетом настоящего описание в целом.

[0066] Термин «приблизительно» применяют в настоящем документе для обозначения примерно, приближенно, около или в районе. При применении термина «приблизительно» в

сочетании с числовым диапазоном он модифицирует этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. Таким образом, «приблизительно 10-20» означает «от приблизительно 10 до приблизительно 20». В общем, термин «приблизительно» может модифицировать числовое значение выше и ниже указанного значения с отклонением, например, на 10 процентов вверх или вниз (более или менее).

[0067] В контексте настоящего документа «интерлейкин-2», «IL2» или «IL-2» относится к любому природному или рекомбинантному IL2, происходящему от любого позвоночного, в том числе млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), а также домашних или сельскохозяйственных млекопитающих, если не указано иное. Данный термин охватывает непроцессированный IL2, а также любую форму IL2, которая возникает в результате процессинга в клетке (т. е. зрелую форму IL2). Термин также охватывает встречающиеся в природе варианты и фрагменты IL2, например, сплайс-варианты или аллельные варианты, и не встречающиеся в природе варианты, которые обладают IL2-активностью встречающихся в природе IL2.

[0068] Для IL2 известны дополнительные последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности. См., например, последовательности под регистрационными номерами GenBank: Q7JFM2 (*Aotus lemurinus* (седобрюхая ночная обезьяна)); Q7JFM5 (*Aotus nancymaae* (западноамазонская мирикина)); P05016 (*Bos taurus* (бык)); Q29416 (*Canis familiaris* (собака) (*Canis lupus familiaris*)); P36835 (*Capra hircus* (козел)); и P37997 (*Equus caballus* (лошадь)).

[0069] Биологически активные фрагменты и варианты IL2 сохраняют IL2-активность. Фраза «биологическая активность IL2» или «IL2-активность» относится к одной или нескольким биологическим активностям IL2, включая без ограничения способность стимулировать лимфоциты, несущие рецептор IL2. Такую активность можно измерить как *in vitro*, так и *in vivo*. IL2 является глобальным регулятором иммунной активности, и наблюдаемые при этом эффекты являются суммой таких активностей. Например, он регулирует активность выживания (Bcl-2), индуцирует Т-эффекторную активность (IFN-гамма, гранзим В и перфорин) и/или стимулирует Т-регуляторную активности (FoxP3).

[0070] Известны биологически активные варианты IL2. См., например, публикации заявок США №№ 20060269515 и 20060160187, а также WO 99/60128.

[0071] Применяемый в контексте настоящего документа термин «CD25», «рецептор IL2 α », «IL2R α » или «IL2Ra» относится к любому природному или рекомбинантному IL2R α ,

происходящему от любого позвоночного, в том числе млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), а также домашних или сельскохозяйственных млекопитающих, если не указано иное. Термин также охватывает встречающиеся в природе варианты IL2R α , например, сплайс-варианты или аллельные варианты, или не встречающиеся в природе варианты, которые обладают IL2R α -активностью. Человеческий IL2 проявляет свои биологические эффекты посредством передачи сигналов через свою рецепторную систему, IL2R. IL2 и его рецептор (IL2R) необходимы для пролиферации Т-клеток и других фундаментальных функций, которые имеют решающее значение для иммунного ответа. IL2R состоит из 3 нековалентно связанных трансмембранных белков I типа, которые представляют собой альфа- (p55), бета- (p75) и гамма- (p65) цепи. Альфа-цепь человеческого IL2R содержит внеклеточный домен из 219 аминокислот, трансмембранный домен из 19 аминокислот и внутриклеточный домен из 13 аминокислот. Секретируемый внеклеточный домен IL2R-альфа (IL2R- α) можно использовать в описанных в настоящем документе слитых белках.

[0072] Для IL2R α известны последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности. См., например, последовательности под регистрационными номерами GenBank: NP_001030597.1 (*Pan troglodytes*); NP_001028089.1 (*Macaca mulatta*); NM_001003211.1 (*Canis lupus*); NP_776783.1 (*Bos taurus*); NP_032393.3 (*Mus musculus*); и NP_037295.1 (*Rattus norvegicus*).

[0073] Также представлены биологически активные фрагменты и варианты внеклеточного домена IL2R α . Такие активные варианты или фрагменты внеклеточного домена IL2R α будут сохранять активность внеклеточного домена IL2R α . Фраза «биологическая активность внеклеточного домена IL2R α » относится к одной или нескольким биологическим активностям внеклеточного домена IL2R α , включая без ограничения способность связываться с IL2 и/или усиливать внутриклеточную передачу сигнала в клетках, способных отвечать на рецептор IL2. Неограничивающие примеры биологически активных фрагментов и вариантов IL2R α раскрыты, например, в Robb et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5654-5658, 1988. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемые в настоящем документе биологически активные фрагменты и варианты IL2R α содержат по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с внеклеточным доменом природного IL2R α .

[0074] Применяемый в контексте настоящего документа термин «встречающийся в природе» применительно к объекту обозначает тот факт, что объект можно найти в природе.

Например, встречающейся в природе является полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), который может быть выделен из источника в природе, и которая не была преднамеренно модифицирована человеком в лаборатории.

[0075] «Полипептид» обозначает цепь, содержащую по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка, без верхнего предела по длине цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как без ограничения гликозилирование, фосфорилирование или образование дисульфидных связей. «Белок» или «слитый белок» может содержать один или несколько полипептидов.

[0076] Настоящее изобретение также относится к фрагментам или вариантам полипептидов и любой их комбинации. Термин «фрагмент» или «вариант» применительно к полипептид-связывающим доменам или полипептид-связывающим молекулам по настоящему изобретению включает любые полипептиды, которые сохраняют по меньшей мере некоторые свойства (например, связывающую активность IL2 в отношении IL2R α) эталонного полипептида. Фрагменты полипептидов включают протеолитические фрагменты, а также подвергнутые делеции фрагменты, но не включают встречающийся в природе полноразмерный полипептид (или зрелый полипептид). Варианты полипептид-связывающих доменов или полипептид-связывающих молекул по настоящему изобретению включают описанные выше фрагменты, а также полипептиды с аминокислотными последовательностями, измененными в результате аминокислотных замен, делеций или вставок. Варианты могут быть встречающимися или не встречающимися в природе. Не встречающиеся в природе варианты можно получить с помощью известных в настоящей области методик мутагенеза. Варианты полипептидов могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеции или добавления.

[0077] Как указано выше, варианты полипептидов включают, например, модифицированные полипептиды. К модификациям относятся, например, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфотидилинозитола, сшивание, циклизация, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование,

образование якоря GPI, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование (Mei *et al.*, *Blood* 116: 270-79 (2010)), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизация, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное переносом РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование и убиквитинирование.

[0078] В данном контексте «соответствующую», «аминокислоту, соответствующую», «сайт, соответствующий» или «эквивалентную аминокислота» в белковой или нуклеотидной последовательности выявляют с помощью выравнивания для нахождения максимальной идентичности или сходства между первой белковой последовательностью, например, последовательности IL2, и второй белковой последовательностью, например, второй последовательностью IL2. Число, применяемое для выявления эквивалентной аминокислоты во второй белковой последовательности, основано на числе, применяемом для выявления соответствующей аминокислоты в первой белковой последовательности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, термин «соответствующий» обозначает взаимосвязь мутации в одной или нескольких аминокислотах в полипептиде или в одном или нескольких нуклеотидах в полинуклеотиде. В качестве неограничивающего примера, конкретная аминокислота (например, S50) полинуклеотида (например, SEQ ID NO:7), который раскрыт в настоящем документе, относится к 50-й аминокислоте, т. е. серину, в последовательности под SEQ ID NO:7.

[0079] Применяемый в контексте настоящего документа термин «связанный с» относится к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первой аминокислотной цепью и второй аминокислотной цепью. В соответствии с одним вариантом осуществления, термин «связанный с» означает ковалентную, непептидную связь или нековалентную связь. Эта связь может быть обозначена двоеточием, т. е. (:). В соответствии с другим вариантом осуществления, она означает ковалентную связь за исключением пептидной связи. Например, аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или дисульфидный мостик с тиольной группой на втором остатке цистеина. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG участки CH1 и CL связаны дисульфидной связью, а две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 согласно системе нумерации Kabat (положение 226 или 229, согласно системе нумерации EU). Примеры ковалентных связей включают без ограничения пептидную связь, металлическую связь, водородную связь, дисульфидную связь,

сигма-связь, пи-связь, дельта-связь, гликозидную связь, агностическую связь, изогнутую связь, дипольную связь, пи-связь остова, двойную связь, тройную связь, четверную связь, пятерную связь, шестерную связь, конъюгацию, гиперконъюгацию, ароматичность, гаптическую или антисвязь. Неограничивающие примеры нековалентной связи включают ионную связь (например, катионную пи-связь или солевую связь), металлическую связь, водородную связь (например, диводородную связь, диводородный комплекс, водородную связь с низким барьером или симметричную водородную связь), ван-дер-ваальсовую силу, лондонскую дисперсионную силу, механическую связь, галогенную связь, ауофильность, интеркаляцию, стэкинг, энтропийную силу или химическую полярность.

[0080] Применяемый в контексте настоящего документа термин «сопоставимый» означает сравниваемую степень или сравниваемый уровень, полученный в результате применения, например, слитого белка, которые равны, практически равны или схожи с эталонной степенью или эталонным уровнем. Применяемый в контексте настоящего документа термин «схожий» означает, что сравниваемая степень или сравниваемый уровень имеют отличие не более чем на 10% или не более чем на 15% от эталонной степени или эталонного уровня. Термин «практически равный» означает, что сравниваемая степень или сравниваемый уровень имеют отличие не более чем на 0,01%, 0,5% или 1% от эталонной степени или эталонного уровня.

[0081] Применяемый в контексте настоящего документа термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого полинуклеотид продуцирует генный продукт, например, РНК или полипептид.

[0082] «Продукт слияния» или белок «слияния» содержит первую аминокислотную последовательность, связанную в рамке считывания со второй аминокислотной последовательностью, с которой он в норме не связан в природе. Аминокислотные последовательности, которые обычно существуют в отдельных белках, можно объединить в слитый полипептид, или аминокислотные последовательности, которые обычно существуют в одном и том же белке, можно разместить в новом порядке в слитом полипептиде, например, в продукте слияния белка IL2 с белком IL2-R α . Слитый белок создают, например, путем химического синтеза или путем создания и трансляции полинуклеотида, в котором в требуемом соотношении кодируются участки пептида. Слитый белок может дополнительно содержать вторую аминокислотную последовательность, связанную с первой аминокислотной последовательностью ковалентной, непептидной связью или нековалентной связью. После

транскрипции/трансляции образуется один белок. Таким образом в один полипептид можно включить несколько белков или их фрагментов. Термин «функционально связанный» подразумевают как означающий функциональную связь между двумя или более элементами. Например, функциональная связь между двумя полипептидами сливает оба полипептида вместе в рамке с образованием единого слитого белка полипептидов. Согласно конкретному аспекту, слитый белок дополнительно содержит третий полипептид, который, как более подробно рассмотрено ниже, может содержать линкерную последовательность.

[0083] «Fc-участок» (кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина), «Fc-домен» или «Fc» относится к С-концевому участку тяжелой цепи антитела, который опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая связывание с рецепторами Fc, расположенными на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках) или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-участок содержит константный участок антитела, за исключением иммуноглобулинового домена первого константного участка (например, CH1 или CL). В изотипах антител IgG, IgA и IgD Fc-участок содержит два идентичных фрагмента белка, происходящих из второго (CH2) и третьего (CH3) константных доменов двух тяжелых цепей антитела; Fc-участки IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (домены 2-4 CH) в каждой полипептидной цепи. У некоторых видов изотип IgG подразделяется на подклассы: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. В случае IgG Fc-участок содержит иммуноглобулиновые домены CH2 и CH3 и шарнир между доменами CH1 и CH2. Хотя определение границ Fc-участка тяжелой цепи иммуноглобулина может варьировать, как определено в настоящем документе, Fc-участок тяжелой цепи человеческого IgG определяют как занимающий от аминокислотного остатка D221 в случае IgG1, V222 в случае IgG2, L221 в случае IgG3 и P224 в случае IgG4 до карбокси-конца тяжелой цепи, причем нумерация представлена согласно системе EU, как у Kabat. Домен CH2 Fc-участка человеческого IgG простирается от аминокислоты 237 до аминокислоты 340, а домен CH3 расположен на С-концевой стороне домена CH2 в Fc-участке, т. е. простирается от аминокислоты 341 до аминокислоты 447 или 446 (если отсутствует С-концевой остаток лизина) или 445 (если отсутствует С-концевой остаток лизина) в IgG. В контексте настоящего документа Fc-участок может представлять собой Fc с природной последовательностью, включая любой аллотипический вариант, или вариант Fc (например, не встречающийся в природе Fc).

[0084] «Рецептор Fc» или «FcR» представляет собой рецептор, который связывается с Fc-участком иммуноглобулина. К FcR, которые связываются с IgG-антителом, относятся рецепторы семейства FcγR, включая аллельные варианты и полученные в результате альтернативного сплайсинга формы этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRII и FcγRIII у мышей, FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIA у людей) рецепторов и одного ингибирующего (FcγRIIB) рецептора. Из уровня техники известны различные свойства человеческих FcγR. Большинство природных типов эффекторных клеток коэкспрессируют один или несколько активирующих FcγR и ингибирующий FcγRIIB, тогда как натуральные киллеры (NK) избирательно экспрессируют один активирующий рецептор Fc (FcγRIII у мышей и FcγRIIA у людей), но не ингибирующий FcγRIIB у мышей и людей. Человеческий IgG1 связывается с большинством человеческих рецепторов Fc и считается эквивалентным мышинному IgG2a по отношению к типам активирующих рецепторов Fc, с которыми он связывается.

[0085] Применяемые в контексте настоящего документа термины «вставленный», «вставлен», «вставленный в» или грамматически родственные термины относятся к положению гетерологичного фрагмента (например, фрагмента, продлевающего период полужизни) в слитом полипептиде относительно аналогичного положения в указанном белке. Применяемые в контексте настоящего документа термины относятся к характеристикам рекомбинантного полипептида, раскрываемого в настоящем документе, и не обозначают, не подразумевают или не предполагают какие-либо способы или процесс, с помощью которых был получен слитый полипептид.

[0086] «Гетерологичный» и «гетерологичный фрагмент» применительно к полипептиду или полинуклеотиду представляет собой полипептид или полинуклеотид, который происходит из другого белка или полинуклеотида. Дополнительные компоненты слитого белка могут происходить из одного и того же организма, что и остальные полипептидные компоненты слитого белка, или дополнительные компоненты могут происходить из другого организма, чем остальные полипептидные компоненты слитого белка. Например, гетерологичный полипептид может быть синтетическим или происходить из другого вида, другого типа клеток индивидуума или одного и того же или другого типа клеток разных индивидуумов. Согласно одному аспекту, гетерологичный фрагмент представляет собой полипептид, слитый с другим полипептидом, с образованием полипептида или слитого белка. Согласно другому аспекту, гетерологичный фрагмент представляет собой неполипептид, такой как ПЭГ,

конъюгированный с полипептидом или белком. Неограничивающими примерами гетерологичных фрагментов, раскрытых в настоящем документе, являются глицин/сериновые линкеры (например, GGSGGGSGGGS (SEQ ID NO:71) (также обозначаемый как (Gly₃Ser)₃)).

[0087] «Fc-участок с природной последовательностью» или «Fc с природной последовательностью» содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности Fc-участка, встречающегося в природе. Fc-участки человека с природной последовательностью включают Fc-участок с природной последовательностью IgG1 человека; Fc-участок с природной последовательностью IgG2 человека; Fc-участок с природной последовательностью IgG3 человека; и Fc-участок с природной последовательностью IgG4 человека, а также их встречающиеся в природе варианты. Нативная последовательность Fc включает различные аллотипы Fc-участков (см., например, Jefferis et al. (2009) *mAbs* 1:1).

[0088] Термин «EC₅₀» в контексте анализа *in vitro* или *in vivo* с применением слитого белка обозначает концентрацию слитого белка, которая индуцирует ответ, который составляет 50% от максимального ответа, т. е. середину между максимальным ответом и исходным уровнем.

[0089] «Консервативные аминокислотные замены» обозначают замены аминокислотного остатка на аминокислотный остаток, имеющий схожую боковую цепь. В уровне техники приведено определение семейств аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи. Такие семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, предполагаемый вспомогательный аминокислотный остаток в слитом белке IL2/IL2R заменяют другим аминокислотным остатком из того же семейства боковой цепи. Способы идентификации нуклеотидных и аминокислотных консервативных замен, которые не устраняют связывание антигена, хорошо известны в настоящей области техники (см.,

например, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); и Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

[0090] Применяемый в контексте настоящего документа термин «молекула нуклеиновой кислоты» понимают как включающий молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной и может представлять собой кДНК.

[0091] Применяемый в контексте настоящего документа термин «регуляторный участок» относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5'-некодирующие последовательности), внутри или ниже (3'-некодирующие последовательности) кодирующего участка, и влияющим на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность или трансляцию ассоциированного кодирующего участка. К регуляторным участкам можно отнести промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты связывания эффекторов и структуры «петля-на-стебле». Если кодирующий участок предназначен для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность окончания транскрипции обычно будут расположены в 3'-направлении от кодирующей последовательности.

[0092] Полинуклеотид, кодирующий генный продукт, например полипептид, может включать промотор и/или другие элементы для контроля транскрипции или трансляции, функционально связанные с одним или несколькими кодирующими участками. Другие элементы для контроля транскрипции, помимо промотора, например энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы окончания транскрипции, также могут быть функционально связаны с кодирующим участком для управления экспрессией генного продукта.

[0093] Специалистам в настоящей области техники известно множество участков для контроля транскрипции. К ним относятся без ограничения участки для контроля транскрипции, которые функционируют в клетках позвоночных, такие как без ограничения промоторные и энхансерные сегменты из цитомегаловирусов (немедленный ранний промотор в сочетании с интроном-А), вируса обезьян 40 (ранний промотор) и ретровирусов (таких как вирус саркомы Рауса). К другим участкам для контроля транскрипции относятся участки, полученные из генов позвоночных, таких как ген актина, белка теплового шока, гормона роста крупного рогатого скота и β -глобина кролика, а также другие последовательности, способные управлять экспрессией генов в эукариотических клетках. К дополнительным подходящим

участкам для контроля транскрипции относятся тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также промоторы, индуцируемые лимфокинами (например, промоторы, индуцируемые интерферонами или интерлейкинами).

[0094] Аналогичным образом рядовым специалистам в настоящей области техники известны различные элементы для контроля трансляции. К ним относятся без ограничения сайты связывания рибосом, кодоны начала и окончания трансляции и элементы, происходящие от пикорнавирусов (в частности, сайт внутренней посадки рибосомы или IRES, также называемый последовательностью CITE).

[0095] Термины «процент идентичности последовательностей», «процент идентичности», «идентичность последовательностей» или «идентичность» применяют взаимозаменяемо, и они обозначают количество идентичных совпадающих положений между двумя полинуклеотидными или полипептидными последовательностями в интервале сравнения с учетом добавлений или делеций (т. е. гэпов), которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Соответствующее положение является любым положением, в котором идентичный нуклеотид или идентичная аминокислота присутствует как в целевой, так и в эталонной последовательности. Гэпы, представленные в целевой последовательности, не принимают в учет, поскольку гэпы не являются нуклеотидами или аминокислотами. Аналогично, гэпы, представленные в эталонной последовательности, не принимают в учет, поскольку в учет принимают нуклеотиды или аминокислоты целевой последовательности, но не нуклеотиды или аминокислоты эталонной последовательности.

[0096] Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно произвести с помощью математического алгоритма, как описано в приведенных ниже неограничивающих примерах.

[0097] Процент идентичности последовательностей рассчитывают путем определения количества положений, в которых идентичный аминокислотный остаток или идентичное основание нуклеиновой кислоты встречается в обеих последовательностях, с получением количества совпадающих положений, путем деления количества совпадающих положений на общее количество положений в интервале сравнения и путем умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности последовательностей между двумя последовательностями можно осуществить с помощью программного обеспечения, легкодоступного как для онлайн-применения, так и для скачивания. Подходящие программы

доступны из различных источников и предназначены для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одной подходящей программой для определения процента идентичности последовательностей является bl2seq, часть пакета программ BLAST, доступная на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Bl2seq проводит сравнение двух последовательностей с помощью алгоритма BLASTN или BLASTP. BLASTN применяют для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как BLASTP применяют для сравнения аминокислотных последовательностей. Другие подходящие программы, например Needle, Stretcher, Water или Matcher, являются частью пакета программ по биоинформатике EMBOSS, а также доступны у Европейского института биоинформатики (EBI) на сайте www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

[0098] Каждый из различных участков в пределах одной полинуклеотидной или полипептидной целевой последовательности, который совпадает при выравнивании с эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательностью, может иметь свой собственный процент идентичности последовательности. Следует отметить, что процентное значение идентичности последовательностей округлено до ближайшей десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округлено до 80,1, тогда как 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округлено до 80,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет целым числом.

[0099] Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить с помощью программы GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступен на сайте globalweb.gcg.com) с применением Матрицы NWSgapdna.CMP и штрафа за открытие гэпа, равного 40, 50, 60, 70 или 80, а также штрафа за продление гэпа, равного 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также можно определить с помощью алгоритма E. Meyers и W. Miller (*CABIOS*, 4: 11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версии 2.0), с использованием матрицы вероятности мутаций PAM120, штрафа за продление гэпа, равного 12, и штрафа за открытие гэпа, равного 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с помощью алгоритма Needleman и Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в программном пакете GCG (доступен по адресу <http://www.gcg.com>), с применением либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, и штрафа за открытие гэпа, равного 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за продление гэпа, равного 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[00100] Описываемые в настоящем документе последовательности нуклеиновой кислоты и белка можно также применять в качестве «последовательности запросов» для выполнения поиска по открытым базам данных, например, для выявления родственных последовательностей. Такие поиски можно проводить с помощью программ NBLAST и XBLAST (версии 2.0) Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Нуклеотидные поиски BLAST можно проводить с помощью программы NBLAST, балл = 100, длина слова = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных описываемым в настоящем документе молекулам нуклеиновой кислоты. Белковые поиски BLAST можно проводить с помощью программы XBLAST, балл = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных описываемым в настоящем документе белковым молекулам. Для получения результатов выравнивания с введенными гэпами с целью сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov.

[00101] Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота является «выделенной» или «практически очищенной», если она очищена от других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, других частей хромосомы) или белков, при помощи стандартных методик, включая щелочную/SDS обработку, CsCl связывание, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в настоящей области. См. F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

[00102] Применяемый в контексте настоящего документа термин «вектор» предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к циклической двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала

репликации, и эписомные векторы млекопитающего). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут встраиваться в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицироваться вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называют в настоящем документе «рекомбинантными векторами экспрессии» (или просто «векторами экспрессии»). В целом, векторы экспрессии, используемые в методиках с применением рекомбинантной ДНК, зачастую имеют форму плазмид. В настоящем описании термины «плазида» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто применяемой формой вектора. Тем не менее, также включены и другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, дефектные по функции репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

[00103] Термин «*in vitro* клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин»), применяемый в контексте настоящего документа, предназначен для обозначения клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая в норме не присутствует в клетке, и, возможно, клетки, в которую вносят рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной клетки субъекта, но и потомства такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут произойти определенные модификации из-за мутаций или воздействий окружающей среды, такое потомство фактически может не быть идентичным родительской клетке, но все еще будет входить в объем применяемого в настоящем документе термина «клетка-хозяин». Примеры клеток-хозяев включают без ограничения прокариотические клетки (например, *E. coli*) или, альтернативно, эукариотические клетки, например, грибковые клетки (например, дрожжевые клетки, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* или *Schizosaccharomyces pombe*) и различные клетки животных, такие как клетки насекомых (например, Sf-9) или клетки млекопитающих (например, HEK293F, CHO, COS-7, NIH-3T3).

[00104] Фраза «непосредственно ниже аминокислоты» в контексте настоящего документа обозначает положение сразу после концевой карбоксильной группы аминокислоты. Точно так же фраза «непосредственно выше аминокислоты» относится к положению сразу после концевой аминокислотной группы аминокислоты. Следовательно, фраза «между двумя аминокислотами сайта вставки» в контексте настоящего документа обозначает положение, в

котором гетерологичный фрагмент (например, фрагмент, увеличивающий период полужизни) вставлен между двумя соседними аминокислотами.

[00105] Применяемый в контексте настоящего документа термин «введение» обозначает физическое введение композиции, содержащей терапевтическое средства, субъекту с помощью любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в настоящей области техники. Различные пути введения для описываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α включают внутривенный, внутривентриальный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другой парентеральный путь введения, например, посредством инъекции или инфузии. Применяемая в контексте настоящего документа фраза «парентеральное введение» означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутричерепную, внутрикапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, внутриспиральную, эпидуральную и интратеральную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно, описанное в настоящем документе антитело можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или чресслизистый путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно производить, например, за один раз, несколько раз и/или в течение одного или более продолжительных периодов.

[00106] «Иммунный ответ» имеет такое же определение, как и в настоящей области техники, и обозначает биологический ответ у позвоночного против чужеродных агентов или патологических, например, раковых клеток, причем такой ответ защищает организм от этих агентов и заболеваний, которые они вызывают. Иммунный ответ опосредуется действием одной или нескольких клеток иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, натурального киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимыми макромолекулами, продуцируемыми любой из этих клеток или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию с, повреждению, разрушению и/или устранению из организма позвоночного вторгшихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или других патологических клеток или, в случае аутоиммунитета

или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей. Иммунная реакция включает, например, активацию или ингибирование Т-клетки, например эффекторной Т-клетки, Th-клетки, CD4⁺ клетки, CD8⁺ Т-клетки или Treg-клетки, или активацию или ингибирование любой другой клетки иммунной системы, например, NK-клетки.

[00107] «Иммуномодулятор» или «иммунорегулятор» обозначает средство, например, средство, нацеленное на компонент сигнального пути, которое может участвовать в модулировании, регулировании или модификации иммунного ответа. «Модуляция», «регулирование» или «модификация» иммунного ответа обозначает любое изменение в клетке иммунной системы или активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки, такой как клетка Th1). Более конкретно, применяемый в контексте настоящего документа термин «модуляция» включает индукцию, ингибирование, потенцирование, повышение, увеличение или уменьшение данной активности или ответа. Такая модуляция включает стимуляцию или супрессию иммунной системы, которая может проявляться в увеличении или уменьшении количества клеток различных типов, увеличении или уменьшении активности этих клеток или любых других изменениях, которые могут происходить в иммунной системе. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых могут обладать усиленной функцией в опухолевом микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммуномодулятор целенаправленно воздействует на молекулу на поверхности Т-клетки. «Иммуномодуляторная целевая молекула» или «иммунорегуляторная целевая молекула» представляет собой молекулу, например, молекулу на поверхности клетки, которая выступает в качестве целевой молекулы для связывания и активность которой изменяется при связывании вещества, средства, фрагмента, соединения или молекулы. К иммуномодуляторным целевым молекулам относятся, например, рецепторы на поверхности клетки («иммуномодуляторные рецепторы») и лиганды рецепторов («иммуномодуляторные лиганды»).

[00108] «Иммунотерапия» обозначает лечение субъекта, страдающего или подверженного риску заражения или рецидива заболевания, способом, предусматривающим индукцию, усиление, супрессию или иную модификацию иммунной системы или иммунного ответа.

[00109] «Иммуностимулирующая терапия» или «иммуностимуляторная терапия» обозначает терапию, которая приводит к увеличению (индуцированию или усилению) иммунного ответа у субъекта, например, для лечения рака.

[00110] «Потенцирование эндогенного иммунного ответа» означает повышение эффективности или действенности существующего иммунного ответа у субъекта. Такое повышение эффективности и действенности можно достичь, например, путем преодоления механизмов, которые супрессируют эндогенный иммунный ответ хозяина, или путем стимуляции механизмов, которые усиливают эндогенный иммунный ответ хозяина.

[00111] «Т-эффекторные» («T_{eff}») клетки относятся к Т-клеткам (например, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеткам) с цитолитической активностью, а также к Т-хелперным (Th) клеткам, например, клеткам Th1, которые секретируют цитокины и активируют и направляют другие иммунные клетки, но не включают регуляторные Т-клетки (клетки Treg). Определенные слитые белки IL2/IL2R α , описываемые в настоящем документе, активируют T_{eff}-клетки, например CD4⁺ и CD8⁺ T_{eff}-клетки и клетки Th1.

[00112] Повышенная способность стимулировать иммунный ответ или иммунную систему может быть результатом усиленной агонистической активности костимулирующих рецепторов Т-клеток и/или повышенной антагонистической активности ингибиторных рецепторов. Повышенная способность стимулировать иммунный ответ или иммунную систему может отражаться кратным увеличением EC₅₀ или максимальным уровнем активности в анализе, с помощью которого измеряют иммунный ответ, например, в анализе, с помощью которого измеряют изменения в выделении цитокинов или хемокинов, цитолитической активности (определяемой непосредственно на целевых клетках или опосредованно посредством детекции CD107a или гранзимов) и пролиферации. Способность стимулировать иммунный ответ или активность иммунной системы может быть повышена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз и более.

[00113] Термины «связанный» и «слитый» в контексте настоящего документа относятся к первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно связанной со второй аминокислотной последовательностью или нуклеотидной последовательностью соответственно. Первая аминокислотная или нуклеотидная последовательность может быть непосредственно соединена или сочленена со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью, или, альтернативно, промежуточная последовательность может ковалентно соединять первую последовательность со второй последовательностью. Термин «связанный» означает не только слияние первой аминокислотной последовательности со второй аминокислотной последовательностью на С-конце или N-конце, но также включает вставку целой первой

аминокислотной последовательности (или второй аминокислотной последовательности) в любых двух аминокислотах во второй аминокислотной последовательности (или первой аминокислотной последовательности соответственно). В соответствии с одним вариантом осуществления, первая аминокислотная последовательность связана со второй аминокислотной последовательностью пептидной связью или линкером. Первая нуклеотидная последовательность может быть связана со второй нуклеотидной последовательностью фосфодиэфирной связью или линкером. Линкер может представлять собой пептид или полипептид (в случае полипептидных цепей), или нуклеотид или нуклеотидную цепь (в случае нуклеотидных цепей), или любой химический фрагмент (в случае для полипептидных, так и для полинуклеотидных цепей). Термин «связанный» также обозначается дефисом (-).

[00114] Применяемый в контексте настоящего документа термин «Т-клеточный ответ» обозначает ответ, опосредуемый Т-клетками, в том числе эффекторными Т-клетками (например, CD8⁺ клетками) и хелперными Т-клетками (например, CD4⁺ клетками). К Т-клеточным ответам относятся, например, Т-клеточная цитотоксичность и пролиферация.

[00115] Применяемый в контексте настоящего документа термин «цитотоксический Т-лимфоцитарный (CTL) ответ» обозначает иммунный ответ, индуцируемый цитотоксическими Т-клетками. CTL-ответы опосредуются в основном CD8⁺ Т-клетками.

[00116] Применяемые в контексте настоящего документа термины «ингибирует» или «блокирует» (например, что касается ингибирования/блокирования связывания IL2 с IL2R α на клетках) применяют взаимозаменяемо, и они охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок IL2/IL2R α ингибирует связывание IL2 с IL2R α по меньшей мере приблизительно на 50%, например, приблизительно на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100%, что определяют, например, так, как далее описано в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок IL2/IL2R α ингибирует связывание IL2 с IL2R α не более чем на 50%, например, приблизительно на 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или 1%, что определяют, например, так, как далее описано в настоящем документе.

[00117] Применяемая в контексте настоящего документа фраза «ингибирует рост опухоли» включает любое измеряемое снижение роста опухоли, например, ингибирование роста опухоли по меньшей мере приблизительно на 10%, например, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере

приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 99% или на 100%.

[00118] Применяемый в контексте настоящего документа термин «рак» относится к широкой группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом патологических клеток в организме. Нерегулируемое деление клеток может привести в результате к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые инвазируют соседние ткани и могут метастазировать в отдаленные части организма по лимфатической системе или кровотоку.

[00119] Применяемые в контексте настоящего документа термины «лечить», «проводить лечение» и «лечение» относятся к любому типу вмешательства или процессу, производимому на субъекте, или к введению активного средства субъекту с целью обращения, облегчения, ослабления, ингибирования, или замедления, или предупреждения прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, патологического состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием, или увеличения общего периода дожития. Лечение может относиться к субъекту, страдающему заболеванием, или субъекту, у которого нет заболевания (например, в случае профилактики). При профилактическом введении описываемый в настоящем документе слитый белок вводят до появления любого симптома. Профилактическое введение вещества служит для предупреждения развития или ослабления любого последующего симптома.

[00120] Под «усилением эффективности» или «усилением иммуногенности» в отношении слитого белка, фармацевтической композиции или вакцины подразумевают улучшение результата, например, измеряемого по изменению определенного значения, такого как увеличение или уменьшение конкретного параметра активности слитого белка, фармацевтической композиции или вакцины, связанной с защитным иммунитетом. В соответствии с одним вариантом осуществления, усиление относится по меньшей мере к 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или более 100% увеличению конкретного параметра. В соответствии с другим вариантом осуществления, усиление относится по меньшей мере к 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или более 100% уменьшению конкретного параметра. В одном примере усиление эффективности/иммуногенности вакцины относится к увеличению способности вакцины ингибировать или лечить прогрессирование заболевания, такому как по меньшей мере 5%,

10%, 25%, 50%, 100% или более 100% повышение эффективности вакцины для этой цели. В дополнительном примере усиление эффективности/иммуногенности вакцины относится к увеличению способности вакцины задействовать естественную защиту субъекта против уже развившихся форм рака, такому как по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или более 100% повышение эффективности слитого белка, фармацевтической композиции или вакцины для этой цели.

[00121] Аналогичным образом, под фразой «преодоление подавленного иммунного ответа» в отношении слитого белка, фармацевтической композиции или вакцины подразумевают улучшение результата, например, измеренного по изменению определенного значения, такое как возврат к ранее положительному значению конкретного параметра активности вакцины, связанной с защитным иммунитетом. В соответствии с одним вариантом осуществления, преодоление относится по меньшей мере к 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или более 100% увеличению конкретного параметра. В одном примере преодоление подавленного иммунного ответа на слитый белок, фармацевтическую композицию или вакцину относится к возобновленной способности белка сияния, фармацевтической композиции или вакцины ингибировать или лечить прогрессирование заболевания, такой как по меньшей мере на 5%, 10 %, 25%, 50%, 100% или более 100% возобновление эффективности вакцины для этой цели.

[00122] «Терапевтически эффективное количество», «терапевтическая доза», «доза», «эффективная доза», «эффективная дозировка» или «количество вводимой дозы», применяемые в настоящем документе (взаимозаменяемо), означают дозу, которая достигает терапевтической цели, описанной в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, «терапевтическая доза» означает дозу, которая вызывает иммунологическую толерантность у субъекта. В соответствии с определенными вариантами осуществления, «терапевтическая доза» означает дозу, которая вызывает иммунологическую толерантность у субъекта в течение периода, составляющего от определенного периода времени до периода толерантности, например, в течение 12 недель после введения первой дозы. «Терапевтически эффективное количество» слитого белка IL2/IL2R α относится к количеству слитого белка IL2/IL2R α , достаточному для того, чтобы вызвать требуемый биологический ответ. Как будет понятно рядовому специалисту в настоящей области техники, абсолютное количество конкретного слитого белка IL2/IL2R α , которое является эффективным, может варьировать в зависимости от таких факторов, как требуемый биологический конечный результат, подлежащий доставке слитый белок IL2/IL2R α , целевая клетка или ткань и др.

Рядовой специалист в настоящей области техники также поймет, что эффективное количество можно вводить в виде разовой дозы или можно достичь путем введения нескольких доз (т. е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и более доз). Способность терапевтического средства стимулировать регрессию заболевания или ингибировать развитие или рецидив заболевания можно оценить с помощью различных способов, известных специалисту-практику, например, на субъектах-людях во время клинических испытаний, на животных модельных системах, позволяющих прогнозировать эффективность у людей, или путем анализа активности средства в анализах *in vitro*.

[00123] Применяемые в контексте настоящего документа термины «лечить», «лечение» и «проводить лечение» относятся, например, к уменьшению тяжести заболевания или патологического состояния; сокращению продолжительности протекания патологического состояния; облегчению или устранению одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или патологическим состоянием; получению полезных эффектов у субъекта с заболеванием или патологическим состоянием без обязательного излечения заболевания или патологического состояния.

[00124] В качестве примера, противораковое средство представляет собой лекарственное средство, которое содействует регрессии рака у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, терапевтически эффективное количество лекарственного средства содействует регрессии рака до состояния устранения рака. «Содействие регрессии рака» означает, что введение эффективного количества лекарственного средства, отдельно или в комбинации с противоопухолевым средством, приводит к уменьшению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, снижению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания, предупреждению нарушения функционирования или инвалидизации вследствие заболевания или другому облегчению симптомов заболевания у пациента. Кроме того, термины «эффективный» и «эффективность» применительно к лечению включают как фармакологическую эффективность, так и физиологическую безопасность. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства содействовать регрессии рака у пациента. Физиологическая безопасность относится к уровню токсичности или другим неблагоприятным физиологическим эффектам на клеточном, органном и/или организменном уровне (неблагоприятным эффектам), возникающим в результате введения лекарственного средства.

[00125] В качестве примера для лечения опухолей, терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства ингибирует рост клеток или опухолевый рост по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 60 % или по меньшей мере приблизительно на 80% относительно субъектов без лечения. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления, терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства полностью ингибирует рост клеток или опухолевый рост, т. е. ингибирует рост клеток или опухолевый рост на 100%. Способность соединения ингибировать опухолевый рост можно оценить с помощью описанных ниже анализов. Альтернативно, это свойство композиции можно оценить путем изучения способности соединения ингибировать рост клеток, такое ингибирование можно измерить *in vitro* с помощью анализов, известных специалисту-практику. В соответствии с некоторыми описанными в настоящем документе вариантами осуществления, регрессия опухоли может наблюдаться и может продолжаться в течение периода по меньшей мере приблизительно 20 суток, по меньшей мере приблизительно 40 суток или по меньшей мере приблизительно 60 суток.

[00126] Термин «пациент» включает людей и других млекопитающих, которые получают профилактическое или терапевтическое лечение.

[00127] Применяемый в контексте настоящего документа термин «субъект» включает любого человека или отличного от человека животного. Например, описываемые в настоящем документе способы и композиции можно применять для лечения субъекта, имеющего рак. Термин «отличное от человека животное» включает всех позвоночных животных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как отличные от человека приматы, овцы, собаки, коровы, цыплята, амфибии, рептилии и т. д.

[00128] Термин доза или введение дозы «по массе», упоминаемый в настоящем документе, означает, что доза, которую вводят пациенту, рассчитана на основе массы пациента. Например, если пациенту с массой тела 60 кг требуется 3 мг/кг антитела к IL2, можно рассчитать и применять соответствующее количество слитого белка IL2/IL2R α (т. е. 180 мг) для введения.

[00129] Применение термина «постоянная доза» в отношении способов и дозировок, описываемых в настоящем документе, означает дозу, которую вводят пациенту без учета массы или площади поверхности тела (BSA) пациента. Поэтому постоянную дозу приводят не в виде дозы в мг/кг, а в виде абсолютного количества средства (например, слитого

белка IL2/IL2R α). Например, человек массой 60 кг и человек массой 100 кг будут получать одинаковую дозу антитела (например, 480 мг слитого белка IL2/IL2R α).

[00130] Применяемые в контексте настоящего документа термины «мкг» и «мкМ» применяют взаимозаменяемо с «микрограмм» и «микромоль» соответственно.

[00131] Различные описываемые в настоящем документе аспекты более подробно описаны в последующих подразделах.

[00132] Все отсылки к нумерации аминокислот у иммуноглобулинов или фрагментов или участков иммуноглобулинов за основую имеют в виду публикацию Kabat *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD. (Рецептор FcRn был выделен из нескольких видов млекопитающих, в том числе людей. Известны последовательности FcRn человека, FcRn крысы и FcRn мыши (Story *et al.*, *J. Exp. Med.* 180:2377 (1994)). Fc может содержать домены CH2 и CH3 иммуноглобулина с шарнирным участком иммуноглобулина или без него. Иллюстративные варианты Fc представлены в публикациях WO 2004/101740 и WO 2006/074199.

7.3 Слитые белки интерлейкина-2/альфа-рецептора интерлейкина-2

[00133] Настоящее изобретение относится к белку слиянию, содержащему по меньшей мере два компонента: (а) первый полипептид, содержащий полипептид интерлейкина-2 (IL2); и (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен полипептида альфа-рецептора интерлейкина-2 (IL2R α). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, внеклеточный домен полипептида IL2R α имеет по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с внеклеточным доменом природного IL2R α (SEQ ID NO:7); и/или (ii) полипептид IL2 имеет по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с природным IL2 (SEQ ID NO:2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок обладает активностью IL2.

7.3.1 Интерлейкин-2

[00134] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к слитому белку, который содержит первый полипептид, содержащий интерлейкин-2 (IL2), слитый в рамке со вторым полипептидом, содержащим внеклеточный домен полипептида альфа-рецептора интерлейкина-2 (IL2R α) или состоящим из него. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок содержит первый

полипептид, содержащий IL2, имеющий последовательность под SEQ ID NO:2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную последовательности под SEQ ID NO:2.

[00135] В соответствии с одним вариантом осуществления, полипептид IL2 является природным или рекомбинантным IL2, происходящему от любого позвоночного, в том числе млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), а также домашних или сельскохозяйственных млекопитающих, если не указано иное.

[00136] Полипептиды IL2, пригодные для настоящего изобретения, экспрессируются в слитом белке. Описанные в настоящем документе слитые белки специфически связывают IL2R человека и, более конкретно, отдельный домен (например, функциональный домен) в пределах внеклеточного домена IL2R α человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок, содержащий IL2, является антагонистом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок, содержащий IL2, связывается с IL2R α человека с высокой аффинностью.

[00137] Термин IL2 охватывает непроцессированный IL2, а также любую форму IL2, которая возникает в результате процессинга в клетке (т. е. зрелую форму IL2). Термин также охватывает встречающиеся в природе варианты и фрагменты IL2, например, сплайс-варианты или аллельные варианты, и не встречающиеся в природе варианты. Аминокислотная последовательность иллюстративной зрелой формы IL2 человека (имеющей сигнальную последовательность из 20 аминокислот) представлена под SEQ ID NO:2. Непроцессированный IL2 человека дополнительно содержит N-концевой сигнальный пептид из 20 аминокислот (SEQ ID NO:1), который отсутствует в зрелой молекуле IL2. Аминокислотная последовательность иллюстративной зрелой формы IL2 мыши (имеющей сигнальную последовательность из 20 аминокислот) представлена под SEQ ID NO:4. Непроцессированный IL2 мыши дополнительно содержит N-концевой сигнальный пептид из 20 аминокислот (SEQ ID NO:3), который отсутствует в зрелой молекуле IL2. Под «природным IL2», также

называемым «IL2 дикого типа», подразумевают встречающийся в природе или рекомбинантный IL2.

[00138] Для IL2 известны дополнительные последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности. См., например, последовательности под регистрационными номерами GenBank: Q7JFM2 (*Aotus lemurinus* (сдобрюхая ночная обезьяна)); Q7JFM5 (*Aotus nancymaae* (западноамазонская мирикина)); P05016 (*Bos taurus* (бык)); Q29416 (*Canis familiaris* (собака) (*Canis lupus familiaris*)); P36835 (*Capra hircus* (козел)); и P37997 (*Equus caballus* (лошадь)).

[00139] Также представлены биологически активные фрагменты и варианты IL2. Такие активные варианты и фрагменты IL2 будут сохранять активность IL2. Биологическая активность IL2 может означать способность стимулировать рецептор IL2 на поверхности лимфоцитах. Такую активность можно измерить как *in vitro*, так и *in vivo*. IL2 является глобальным регулятором иммунной активности, и наблюдаемые при этом эффекты являются суммой таких активностей. Например, он регулирует активность выживания (Bcl-2), индуцирует Т-эффекторную активность (IFN-гамма, гранзим В и перфорин) и стимулирует Т-регуляторную активности (FoxP3). См., например, Malek *et al.* (2010) Immunity 33(2):153-65.

[00140] Известны биологически активные варианты IL2. См., например, публикации заявок США №№ 2006/0269515 и 2006/0160187 и WO 99/60128.

[00141] Биологически активные фрагменты и варианты IL2 можно использовать в раскрываемых в настоящем документе слитых белках. Такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150 или более последовательных аминокислот с последовательностью под SEQ ID NO:2. Альтернативно, функциональный вариант может иметь по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:2.

[00142] Дополнительно представлены активные варианты и фрагменты полинуклеотидов, кодирующих белки IL2. Такой полинуклеотид может содержать по меньшей мере 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 последовательных нуклеотидов последовательности под SEQ ID NO:2, кодирующей полипептид, и продолжать кодировать белок, обладающий активностью IL2. Альтернативно, функциональный полинуклеотид может иметь по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности

последовательности с полинуклеотидом, кодирующим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:2, и продолжать кодировать функциональный полипептид IL2.

[00143] Иллюстративные полипептидные последовательности IL2 изложены в представленной ниже таблице 1.

Таблица 1.

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	IL2 (человека, непроцессированный)	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLL DLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC LEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
2	IL2 (человека, зрелая форма)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT
3	IL2 (мышь, непроцессированный)	MYSMQLASCVTLTLVLLVNSAPTSSSTSSSTAEAQQQQQ QQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTFKF YLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDA ENFISNIRVTVVKLGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRW IAFCQSIISTSPQ
4	IL2 (мышь, зрелая форма)	APTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELL SRMENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELG PLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLGSDNT FECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ

[00144] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, представленные в настоящем документе слитые белки могут содержать по меньшей мере одну мутацию в пределах внеклеточного домена IL2 α . В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полипептид IL2 имеет по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с природным IL2 (SEQ ID NO:2). В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления, факт наличия по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше связано с одной или несколькими мутациями, которые удаляют сайт гликозилирования.

[00145] В соответствии с другими вариантами осуществления, слитый белок содержит мутацию, которая заключается в замене аминокислоты, имеющей сайт гликозилирования, на аминокислоту, не имеющую сайт гликозилирования. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация удаляет сайт О-гликозилирования и/или сайт N-гликозилирования. В соответствии с одним вариантом осуществления, мутация удаляет сайт О-гликозилирования, например, треонин, являющейся 3-й аминокислотой в последовательности под SEQ ID NO:2. В соответствии с другим вариантом осуществления, мутация удаляет сайт N-гликозилирования.

[00146] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты из IL2, которая гликозилирована, на аминокислоту, которая не гликозилирована. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты из IL2, которая обеспечивает возможность гликозилирования на соседней аминокислоте, на аминокислоту, которая не обеспечивает возможность гликозилирования на соседней аминокислоте.

[00147] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен аминокислоты из IL2 представляют собой замену с аланина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

[00148] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен аминокислоты из IL2 представляют собой замену с треонина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

[00149] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен аминокислоты из IL2 представляют собой замену с реакционноспособной аминокислоты, например, цистеина, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из

аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с цистеина на серин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с цистеина на аланин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с цистеина на валин.

[00150] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен приходятся на аминокислоту T3 из IL2 относительно соответствующей последовательности под SEQ ID NO:2.

[00151] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна из замен приходится на аминокислоту C125 из последовательности под SEQ ID NO:2. В соответствии с конкретным вариантом осуществления, замена в аминокислоте C125 выбрана из группы, состоящей из C125S, C125A и C125V.

[00152] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация представляет собой делецию. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, делеция приходится на аминокислоту A1 из последовательности под SEQ ID NO:2.

[00153] Настоящее раскрытие также относится к любым другим мутациям в полипептиде IL2. В соответствии с другими вариантами осуществления, к мутациям также относятся одна или несколько замен, которые улучшают свойства IL2, например, увеличивают активность IL2, увеличивают период полужизни IL2, увеличивают стабильность и т. д.

[00154] Как рассмотрено ниже в настоящем разделе, указанные в настоящем документе мутации представляют собой мутации относительно аминокислотных положений в последовательности под SEQ ID NO:2. В соответствии с настоящим изобретением, в одном или нескольких описываемых в настоящем документе слитых белках IL2 можно использовать любую из описанных ниже мутаций, отдельно или в комбинации с другими раскрытыми мутациями или любыми известными из уровня техники мутациями.

[00155] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, описанных в публикации Carmenate *et al.*, *J Immunol*, 200 (10) 3475-3484 (2018) и/или в публикации US 8759486: например, в аминокислотном остатке Q22, Q126, I129, S130 или любую их комбинацию, например, Q22V, Q126A, I129D, S130G или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2

содержит одну или несколько мутаций L18N, Q126Y и S130R, которые раскрыты в публикации US 8759486 B2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций Q13Y, Q126Y, I129D, и S130R, которые раскрыты в публикации US 8759486 B2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций K35E, K35D и K35Q, которые раскрыты в публикации WO 2018/091003 A1.

[00156] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации Epstein et al. *Blood*, 101(12):4853-61] (2003) и/или в публикации US 7371371: например, в аминокислотном остатке R38, например, R38W. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит мутацию R38W и одну или несколько мутаций за пределами аминокислотных положений 22-58 из IL2, как раскрыто в публикации US 7371371 B2.

[00157] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации Wittrup et al. *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009) и/или в публикации US 8906356: например, аминокислотный остаток 91, 126 или оба, например, V91R, Q126T или обе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит мутацию E15W, как раскрыто в публикации Wittrup et al. *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009), а также в публикации US 8906356. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или обе мутации N88R и V91R, как раскрыто в публикации Wittrup et al. *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009), а также в публикации US 8906356. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит мутацию Q126T или Q126I, как раскрыто в публикации Wittrup et al. *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009) и/или в публикации US 8906356.

[00158] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации US 8906356 B2: например, в аминокислоте 69, 74, 91, 126, или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация представляет собой V91R, Q126T, Q126L, Q127T или любую их комбинацию, как раскрыто в публикации US 8906356 B2.

[00159] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации Wittrup et al. *J Immunother.* 32(9):887-94 (2009) и/или в публикации US 7569215 B2: например, в аминокислотном остатке E15, N30, E68, V69, N71, S75, N90 или любой их комбинации, например, N30S, E68D, V69A, N71A, S75P, N90H или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления,

IL2 содержит мутацию E15W, как раскрыто в публикации Wittrup *et al. Biochemistry*, Vol. 44, No. 31 (2005). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация представляет собой V69A, как раскрыто в публикации US 7569215 B2.

[00160] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации Wittrup *et al. J Immunother.* 32(9):887-94 (2009) и/или в публикации US 7951360 B2: например, в аминокислотном остатке N29, Y31, K35, T37, K48, V69, N71, N88 или любой их комбинации, например, N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, N88D или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит мутацию E15W, как раскрыто в публикации Wittrup *et al. Biochemistry*, Vol. 44, No. 31 (2005).

[00161] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации Wittrup *et al. J Immunother.* 32(9):887-94 (2009) и/или в US 8349311 B2: например, в аминокислоте 69, 74, 128 или любой их комбинации, например, V69A, I128P или любую их комбинацию.

[00162] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации Wittrup *et al. J Immunother.* 32(9):887-94 (2009): например, в аминокислотном остатке S4, T10, Q11, V69, N88, T133 или любой их комбинации, например, S4P, T10A, Q11R, V69A, N88D, T133A или любую их комбинацию.

[00163] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации Wittrup *et al. J Immunother.* 32(9):887-94 (2009): например, в аминокислотном остатке N30, V69, I128 или любой их комбинации, например, N30S, V69A, I128T или любую их комбинацию.

[00164] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации Wittrup *et al. J Immunother.* 32(9):887-94 (2009): например, в аминокислотном остатке K8, Q13, N26, N30, K35, T37, V69 или любой их комбинации, например, K8R, Q13R, N26D, N30T, K35R, T37R, V69A или любую их комбинацию.

[00165] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации Shanafelt *et al., Nat Biotechnol.*, 18(11):1197-202 (2000), например, в аминокислотном остатке N88, например, N88R.

[00166] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации US 9616105 B2: например, в

аминокислотах 20, 88, 126 или любой их комбинации, например, N88R, N88G или N88I. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит мутацию N88R, N88G или N88I, как раскрыто в публикации US 9616105 B2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит мутацию D20H, D20I или D20Y, как раскрыто в публикации US 9616105 B2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит мутацию Q126L, как раскрыто в публикации US 9616105 B2.

[00167] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации US 2018/0125941 A1: например, D20H, N88I, N88G, N88R, Q126L, Q126F или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций T3A, N88G, N88R, D20H, C125S, Q126L и Q126F, как раскрыто в публикации US 2018/0037624 A1.

[00168] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации US 2017/0327555 A1: например, в аминокислотном остатке N88, D20, C125, Q126 или любой их комбинации, например, N88G, N88R, D20H, C125S, Q126L, Q126F или любую их комбинацию.

[00169] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации WO 2016/025385 A1: например, в аминокислотном остатке D109, C125 или обоих, например, D109C, C125S или обе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации WO 2016/025385 A1: например; в аминокислотном остатке D20, N88, Q126, C125, Q126 или любой их комбинации, например, D20H, N88I, N88G, N88R, Q126L, C125S, Q126F или любую их комбинацию.

[00170] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации WO 2016/164937 A1: например, в аминокислотном остатке L12, Q13, E15, H16, L19, D20, M23, D84, S87, N88, V91, E95 или любой их комбинации, например, L12G, L12K, L12Q, L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q, D84R, D84S, D84T, S87E, N88A, N88D, N88E, N88F, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91S, E95G или любую их комбинацию.

[00171] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации US 9932380 B2 или в публикации US

9580486: например, в аминокислотном остатке V91, например, V91K. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 дополнительно содержит мутацию C125A или C125S. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 дополнительно содержит мутацию в T3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация в T3 является одной из T3A или T3N. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит мутацию в S5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация представляет собой S5T.

[00172] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации US 9732134 B2: например, в E15, H16, Q22, D84, N88, E95 или любой их комбинации.

[00173] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит одну или несколько мутаций, раскрытых в публикации US 2015/0218260 A1: например, N88D. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит мутацию раскрытую в US 9266938 B2: например, в аминокислоте 42, 45, 72 или любой их комбинации, например, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R или L72K. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит мутацию F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R и F42K. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит мутацию Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R и Y45K.

[00174] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, IL2 содержит от одной до четырех мутаций: первую мутацию L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R или L72K, вторую мутацию F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R или F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R или Y45K, третью мутацию T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K или T3P и/или четвертую мутацию C125A, C125S, C125T или C125V. Мутации, перечисленные в настоящем документе или раскрытые в патентах, патентных публикациях или любых других упомянутых в настоящем документе источника, включены в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки.

7.3.2 Альфа-рецептор интерлейкина-2

[00175] Слитый белок содержит второй полипептид, содержащий внеклеточный домен альфа-рецептора интерлейкина-2 (IL2R α). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, внеклеточный домен IL2R α содержит аминокислотную последовательность,

представленную под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную последовательности под SEQ ID NO:7.

[00176] Применяемый в контексте настоящего документа термин «CD25» или «а-рецептор IL2» «IL2R α », «IL2R α », «IL2-R α » и «IL2-R α » относится к любому природному или рекомбинантному IL2R α , происходящему от любого позвоночного, в том числе млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), а также домашних или сельскохозяйственных млекопитающих, если не указано иное. Термин также охватывает встречающиеся в природе варианты IL2R α , например, сплайс-варианты или аллельные варианты, или не встречающиеся в природе варианты. Человеческий IL2 проявляет свои биологические эффекты посредством передачи сигналов через свою рецепторную систему, IL2R. IL2 и его рецептор (IL2R) необходимы для пролиферации и других фундаментальных функций Т-клеток, которые имеют решающее значение для формирования иммунного ответа. IL2R состоит из 3 нековалентно связанных трансмембранных белков I типа, которые представляют собой альфа- (p55), бета- (p75) и гамма- (p65) цепи. Альфа-цепь человеческого IL2R содержит внеклеточный домен из 219 аминокислот, трансмембранный домен из 19 аминокислот и внутриклеточный домен из 13 аминокислот. Секретируемый внеклеточный домен IL2R-альфа (IL2R α) можно использовать в описанных в настоящем документе слитых белках.

[00177] Аминокислотная последовательность иллюстративной зрелой формы IL2R α человека представлена под SEQ ID NO:6. Непроцессированный IL2R α человека показан под SEQ ID NO:5. Внеклеточный домен из последовательности под SEQ ID NO:5 и/или под SEQ ID NO:6 представлен под SEQ ID NO:7. Аминокислотная последовательность иллюстративной зрелой формы IL2R α мыши представлена под SEQ ID NO:9. Непроцессированный IL2R α мыши показан под SEQ ID NO:8. Внеклеточный домен из последовательности под SEQ ID NO:8 и/или под SEQ ID NO:9 представлен под SEQ ID NO:10.

Под «природным IL2R α », также называемым «IL2R α дикого типа», подразумевают встречающийся в природе или рекомбинантный IL2R α .

[00178] Для IL2R α известны последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности. См., например, последовательности под регистрационными номерами GenBank: NP_001030597.1 (*P. troglodytes*), NP_001028089.1 (*M. mulatta*), NM_001003211.1 (*C. lupus*), NP_776783.1 (*B. taurus*), NP_032393.3 (*M. musculus*) и NP_037295.1 (*R. norvegicus*).

[00179] В контексте настоящего документа внеклеточный домен IL2R α означает функциональный внеклеточный домен IL2R α , выполняющий свою нормальную роль в связывании с IL2, если не указано иное. Термин ЕС-домен IL2R α включает его функциональный фрагмент, вариант, аналог или производное, которые сохраняют функцию полноразмерного ЕС IL2R α дикого типа при связывании с IL2. ЕС домен IL2R α может представлять собой ЕС-домен IL2R α человека, свиньи, собаки, крысы или мыши. Фраза «биологическая активность ЕС-домена IL2R α » относится к одной или нескольким биологическим активностям ЕС-домена IL2R α , включая без ограничения способность усиливать передачу внутриклеточных сигналов в клетках, способных отвечать на рецептор IL2. Неограничивающие примеры биологически активных фрагментов и вариантов ЕС-домена IL2R α раскрыты, например, в публикации Robb et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5654-5658, 1988. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемые в настоящем документе биологически активные фрагменты и варианты ЕС-домена IL2R α содержат по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с внеклеточным доменом природного IL2R α .

[00180] Биологически активные фрагменты и варианты внеклеточного домена IL2R α можно использовать в раскрываемых в настоящем документе слитых белках. Такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 215 или более последовательных аминокислот внеклеточного домена с любой из последовательностей под SEQ ID NO:7. Альтернативно, функциональный вариант может иметь по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:7.

[00181] Дополнительно представлены активные варианты и фрагменты полинуклеотидов, кодирующих внеклеточный домен IL2R α . Такой полинуклеотид может

содержать по меньшей мере 100, 200, 300, 400, 500, 600 или более последовательных нуклеотидов последовательности под SEQ ID NO:7, кодирующей полипептид, и продолжать кодировать белок, обладающий активностью внеклеточного домена IL2R α . Альтернативно, функциональный полинуклеотид может иметь по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с полинуклеотидом, кодирующим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:7, и продолжать кодировать белок, обладающий активностью внеклеточного домена IL2R α .

[00182] Полипептидные последовательности IL2R α изложены в таблице 2.

Таблица 2.

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
5	IL2R α (человека, непротессированная форма)	MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAE LCDDDPPEI PHATFKAMAY KEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQC TSSATRN TTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPG HCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPA ESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEG RPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAVAGC VFL LISVLLLSGLTWQRRQRKSRRTI
6	IL2R α (человека, зрелая форма)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGS LYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRN TTKQVTPQPEEQKE RKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVV GQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT GEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEM AATMETSIFTTEYQVAVAGCVFL LISVLLLSGLTWQRRQRK SRRTI
7	IL2R α (человека, зрелая форма внеклеточного домена IL2R α)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGS LYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRN TTKQVTPQPEEQKE RKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVV GQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT

		GEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEM AATMETSIFTTEYQ
8	IL2R α (мышь, непроцессированная форма)	MEPRLMLGFLSLTIVPSCRAELCLYDPPEVPNATFKALSY KNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNH DKSRKQVTAQLEHQKEQQTTTDMQKPTQSMHQENLTGHCRE PPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISIC KMKCGKTGWTQPQLTCVDEREHHRFLASEESQGSRNSSPES ETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFVLTMEYKVAVASCLFLL ISILLLSGLTWQHRWRKSRTI
9	IL2R α (мышь, зрелая форма)	ELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELV YMRCLGNSWSSNCQCTSNHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTTT DMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSV HYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCVDERE HHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMT ETFVLTMEYKVAVASCLFLLISILLLSGLTWQHRWRKSRT I
10	IL2R α (мышь, зрелая форма внеклеточного домена IL2R α)	ELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELV YMRCLGNSWSSNCQCTSNILRASHDKSRKQVTAQLEHQKEQ QTTTDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDSKRIYHFVE GQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTCV DEREHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTET TAMTETFVLTMEYK
11	IL2R α (человека, зрелая форма внеклеточного домена IL2R α) – полностью укороченный	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGS LYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKE RKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVV GQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT GE
12	IL2R α (человека, зрелая форма внеклеточного домена IL2R α) – укороченный наполовину	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGS LYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKE RKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVV GQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT GEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS

[00183] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, представленные в настоящем документе слитые белки могут содержать по меньшей мере одну мутацию в пределах ЕС-домена IL2R α .

[00184] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, у ЕС-домена полипептида IL2R α по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше, по меньшей мере на два сайта гликозилирования меньше, по меньшей мере на три сайта гликозилирования меньше, по меньшей мере на четыре сайта гликозилирования меньше, по меньшей мере на пять сайтов гликозилирования меньше, по меньшей мере на шесть сайтов гликозилирования меньше, по меньшей мере на семь сайтов гликозилирования меньше, по меньшей мере на восемь сайтов гликозилирования меньше или по меньшей мере на девять сайтов гликозилирования меньше по сравнению с внеклеточным доменом природного IL2R α (SEQ ID NO:7).

[00185] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ЕС-домен полипептида IL2R α , у которого по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше, содержит мутацию, которая удаляет сайт гликозилирования. В соответствии с другими вариантами осуществления, слитый белок содержит мутацию, которая заключается в замене аминокислоты, имеющей сайт гликозилирования, на аминокислоту, не имеющую сайт гликозилирования. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация удаляет сайт О-гликозилирования и/или сайт N-гликозилирования. В соответствии с одним вариантом осуществления, мутация удаляет сайт О-гликозилирования. В соответствии с другим вариантом осуществления, мутация удаляет сайт N-гликозилирования.

[00186] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация в слитом белке представляет собой делецию С-конца IL2R α . В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация является делецией аминокислот 167-219 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация является делецией аминокислот 168-219 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация является делецией аминокислот 169-219 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация является делецией аминокислот 170-219 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация является делецией аминокислот 171-219 из последовательности под

[illegible]

некоторыми вариантами осуществления, мутация является делецией аминокислот 191-219 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация является делецией аминокислот 192-219 из последовательности под SEQ ID NO:7.

[00187] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация является делецией аминокислот от 167, 168, 169 или 171 до 192 или 219 включительно, соответствующих последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, мутация не включает делецию 170-219, соответствующих последовательности под SEQ ID NO:7.

[00188] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второй полипептид содержит, аминокислотную последовательность фактически состоит из или состоит из нее, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:11. В соответствии с другими вариантами осуществления, второй полипептид содержит, последовательность под SEQ ID NO:11 фактически состоит или состоит из нее и +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 соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второй полипептид содержит последовательность под SEQ ID NO:11 фактически состоит из или состоит из нее, не более чем с 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второй полипептид содержит, аминокислотную последовательность фактически состоит из или состоит из нее, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:12.

[00189] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок содержит одну или несколько мутаций. В соответствии с некоторыми вариантами

осуществления, одна или несколько мутаций представляет собой одну или несколько замен аминокислоты из IL2R α , которая гликозилирована, на аминокислоту, которая не гликозилирована.

[00190] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен аминокислот из IL2R α приходятся на аминокислоту N49, аминокислоту N68, аминокислоту T74, аминокислоту T85, аминокислоту T197, аминокислоту T203, аминокислоту T208 и аминокислоту T216 или любую их комбинацию, причем расположения аминокислот соответствуют последовательности под SEQ ID NO:7.

[00191] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с аспарагина на другую аминокислоту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с аспарагина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

[00192] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с треонина на другую аминокислоту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько замен представляют собой замену с треонина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[00193] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту N49 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота N49 из последовательности под SEQ ID NO:7 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

[00194] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту N68 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота N68 из последовательности под SEQ

ID NO:7 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

[00195] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту T74 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота T74 из последовательности под SEQ ID NO:7 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[00196] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту T85 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота T85 из последовательности под SEQ ID NO:7 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[00197] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту T197 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота T197 из последовательности под SEQ ID NO:7 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[00198] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту T203 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота T203 из последовательности под SEQ ID NO:7 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[00199] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту T208 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота T208 из последовательности под SEQ ID NO:7 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[00200] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту T216 из последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота T216 из последовательности под SEQ ID NO:7 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[00201] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок содержит одну или несколько мутаций. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, одна или несколько мутаций представляют собой одну или несколько замен аминокислоты из IL2R α , которая обеспечивает возможность гликозилирования на соседней аминокислоте, на аминокислоту, которая не обеспечивает возможность гликозилирования на соседней аминокислоте.

[00202] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту S50, аминокислоту S51, аминокислоту T69, аминокислоту T70, аминокислоту C192 или любую их комбинацию, причем расположения аминокислот соответствуют последовательности под SEQ ID NO:7.

[00203] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту S50 согласно последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота S50 согласно последовательности под SEQ ID NO:7 мутирована в пролин.

[00204] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту S51 согласно последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота S51 согласно последовательности под SEQ ID NO:7 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы,

состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

[00205] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту T69 согласно последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота T69 согласно последовательности под SEQ ID NO:7 мутирована в пролин.

[00206] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту T70 согласно последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота T70 согласно последовательности под SEQ ID NO:7 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

[00207] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, замена приходится на аминокислоту C192 согласно последовательности под SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аминокислота C192 согласно последовательности под SEQ ID NO:7 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

7.3.3 Линкер

[00208] Слитый белок по настоящему раскрытию может дополнительно содержать линкер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, линкер может связывать первый полипептид со вторым полипептидом от N-конца к C-концу, например, N-IL2-linker-IL2R α EC-C. В соответствии с другими вариантами осуществления, линкер может связывать второй полипептид с первым полипептидом от N-конца к C-концу, например, N-IL2R α EC-linker-IL2-C.

[00209] В соответствии с одним вариантом осуществления, слитый белок IL2/IL2R α содержит линкерную последовательность, расположенную между полипептидом IL2 и полипептидом IL2R α . Линкер может иметь любую длину и может содержать по меньшей

мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50 или 60 или более аминокислот. В соответствии с другими вариантами осуществления, линкер, пригодный для настоящего раскрытия, имеет по меньшей мере одну аминокислоту и менее 100 аминокислот, менее 90 аминокислот, менее 80 аминокислот, менее 70 аминокислот, менее 60 аминокислот, менее 50 аминокислот, менее 40 аминокислот, менее 30 аминокислот, менее 20 аминокислот, менее 19 аминокислот, менее 18 аминокислот, менее 17 аминокислот, менее 16 аминокислот, менее 15 аминокислот, менее 14 аминокислот, менее 13 аминокислот или менее 12 аминокислот. В соответствии с одним вариантом осуществления, линкерная последовательность содержит аминокислотные остатки глицина. В других случаях линкерная последовательность содержит комбинацию аминокислотных остатков глицина и серина.

[00210] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок содержит линкер, слитый в рамке между первым полипептидом и вторым полипептидом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок содержит линкер, представляющий собой глицин/сериновый линкер. Такие глицин/сериновые линкеры могут содержать любую комбинацию аминокислотных остатков, включая без ограничения пептид GGGS (SEQ ID NO:174) или GGGGS (SEQ ID NO:72) или их повторы, в том числе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более повторов таких указанных пептидов. Раскрываемые в настоящем документе глицин/сериновые линкеры содержат аминокислотную последовательность (GS)_n, (GGS)_n, (GGGS)_n, (GGGGS)_n или (GGGGS)_n, где n представляет собой целое число 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В соответствии с конкретным вариантом осуществления, линкерная последовательность содержит GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO:71) (также обозначаемую как (Gly₃Ser)₃). В соответствии с другим вариантом осуществления, линкерная последовательность содержит GGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO:74) (также обозначаемую как (Gly₃Ser)₄). В соответствии с другими вариантами осуществления, линкерная последовательность содержит одну из (Gly₃Ser)₅ (GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS) (SEQ ID NO:75), (Gly₃Ser)₆ (GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS) (SEQ ID NO:76) или (Gly₃Ser)₇ (GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS) (SEQ ID NO:77). В соответствии с другими вариантами осуществления, линкерная последовательность содержит (Gly₄Ser)₃ (GGGGSGGGSGGGSGGGS), которая изложена под SEQ ID NO:78. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления, линкерная последовательность содержит GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO:79) (также обозначаемую как (Gly₄Ser)₄);

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:80) (также обозначаемую как (Gly₄Ser)₅); (Gly₄Ser)₂ (GGGGSGGGGS) (SEQ ID NO:81), (Gly₄Ser)₁ (GGGGS) (SEQ ID NO:82), (Gly₄Ser)₆ (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS) (SEQ ID NO:83); (Gly₄Ser)₇ (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS) (SEQ ID NO:97); или (Gly₄Ser)₅ (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS) (SEQ ID NO:84).

7.3.4 Гетерологичный фрагмент

[00211] Слитый белок по настоящему раскрытию может дополнительно содержать дополнительный элемент, например, гетерологичный фрагмент. Такие элементы могут содействовать экспрессии слитого белка, содействовать секреции слитого белка, улучшать стабильность слитого белка, делать возможной более эффективную очистку белка и/или модулировать активность слитого белка. В соответствии с некоторым вариантом осуществления, гетерологичный фрагмент представляет собой полипептидный фрагмент. В соответствии с другими вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент представляет собой неполипептидный фрагмент.

[00212] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок содержит гетерологичный фрагмент, слитый с первым полипептидом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок содержит полипептидный фрагмент, слитый со вторым полипептидом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок содержит гетерологичный фрагмент, слитый с первым полипептидом и вторым полипептидом.

[00213] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемые в настоящем документе слитые белки содержат один или несколько дополнительных гетерологичных фрагментов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичные фрагменты представляют собой фрагменты, увеличивающие период полужизни. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент содержит альбумин, иммуноглобулиновый константный участок или его часть, связывающий иммуноглобулин полипептид, иммуноглобулин G (IgG), связывающий альбумин полипептид (ABP), фрагмент для ПАСилирования, фрагмент для ГЭКиления, XTEN, фрагмент для ПЭГиления, Fc-участок и любую их комбинацию.

1) Константный участок иммуноглобулина или его часть

[00214] Константный участок иммуноглобулина состоит из доменов, обозначаемых СН (константные тяжелые) домены (СН1, СН2 и т. д.). В зависимости от изотипа, (т. е. IgG, IgM, IgA, IgD или IgE) константный участок может состоять из трех или четырех доменов СН. У некоторых изотипов (например, IgG) константные участки также содержат шарнирный участок. См. публикацию Janeway *et al.* 2001, *Immunobiology*, Garland Publishing, N.Y., N.Y.

[00215] Иммуноглобулиновый константный участок или его часть для получения слитого белка согласно настоящему раскрытию можно получить из ряда различных источников. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления, иммуноглобулиновый константный участок или его часть получен из иммуноглобулина человека. Тем не менее, понятно, что иммуноглобулиновый константный участок или его часть могут быть получены из иммуноглобулина другого вида млекопитающих, включая, например, виды грызуна (например, мышь, крысу, кролика, морскую свинку) или отличных от человека приматов (например, шимпанзе, макаки). Более того, иммуноглобулиновый константный участок или его часть могут быть получены из иммуноглобулинов любого класса, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и иммуноглобулина любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В соответствии с одним вариантом осуществления, применяют изотип IgG1 человека.

[00216] Различные последовательности гена иммуноглобулинового константного участка (например, последовательности гена константного участка человека) доступны в виде общедоступных депозитариев. Можно подобрать последовательность доменов константного участка с конкретной эффекторной функцией (или с отсутствием конкретной эффекторной функции) или с конкретной модификацией для снижения иммуногенности. Были опубликованы многие последовательности антител и генов, кодирующих антитела, и из этих последовательностей с помощью признанных в настоящей области методик можно получить подходящие последовательности константных участков Ig (например, последовательности шарнира, СН2 и/или СН3 или их части). Генетический материал, полученный с помощью любого из вышеперечисленных способов, затем можно изменить или синтезировать с получением полипептидов по настоящему раскрытию. Кроме того, следует понимать, что объем настоящего раскрытия охватывает аллели, варианты и мутации ДНК-последовательностей константного участка.

[00217] Последовательности иммуноглобулинового константного участка или его части можно клонировать, например, с помощью полимеразной цепной реакции и праймеров, которые подобраны для амплификации представляющего интерес домена. Для клонирования последовательности иммуноглобулинового константного участка или его части из антитела можно выделить мРНК из клеток гибридомы, селезенки или лимфы, обратно транскрибировать ее в ДНК, а гены антител амплифицировать с помощью ПЦР. Способы ПЦР-амплификации подробно описаны в патентах США №№ 4683195; 4683202; 4800159; 4965188; и, например, в публикации “PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications” Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, CA (1990); Ho et al. 1989. *Gene* 77:51; Horton et al. 1993. *Methods Enzymol.* 217:270). ПЦР можно инициировать консенсусными праймерами константного участка или более специфическими праймерами, которые основаны на опубликованных ДНК-последовательностях и аминокислотных последовательностях тяжелой и легкой цепей. Как рассмотрено выше, ПЦР также можно использовать для выделения клонов ДНК, кодирующих легкую и тяжелую цепи антитела. В этом случае библиотеки можно подвергнуть скринингу с помощью консенсусных праймеров или более крупных гомологичных зондов, таких как зонды константного участка мыши. В настоящей области известны многочисленные наборы праймеров, подходящие для амплификации генов антител (например, 5'-праймеры на основе N-концевой последовательности очищенных антител (Benhar and Pastan. 1994. *Protein Engineering* 7:1509); для быстрой амплификации концов кДНК (Ruberti, F. *et al.* 1994. *J. Immunol. Methods* 173:33); для лидерных последовательностей антител (Larrick *et al.* 1989 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:1250). Клонирование последовательностей антител дополнительно описано в публикации Newman et al., патент США № 5658570, поданном 25 января 1995 года.

[00218] В контексте настоящего документа иммуноглобулиновый константный участок может включать все домены и шарнирный участок или его части. В соответствии с одним вариантом осуществления, иммуноглобулиновый константный участок или его часть содержит домен CH2, домен CH3 и шарнирный участок, т. е. Fc-участок или FcRn-связывающий партнер.

[00219] В контексте настоящего документа термин «Fc-участок» определяют как часть полипептида, которая соответствует Fc-участку природного иммуноглобулина, т. е. образованную димерной ассоциацией соответствующих Fc-доменов двух его тяжелых цепей. Природный Fc-участок образует гомодимер с другим Fc-участком.

[00220] В соответствии с одним вариантом осуществления, «Fc-участок» относится к части одной тяжелой цепи иммуноглобулина, начинающейся в шарнирном участке непосредственно перед сайтом расщепления папаином (т. е. остаток 216 в IgG, принимая первый остаток константного участка тяжелой цепи за 114) и оканчивающейся на С-конце антитела. Соответственно, полный Fc-домен содержит по меньшей мере шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3.

[00221] Fc-участок иммуноглобулинового константного участка в зависимости от изотипа иммуноглобулина может включать домены CH2, CH3 и CH4, а также шарнирный участок. Слитые белки, содержащие Fc-участок иммуноглобулина, наделяют слитый белок несколькими требуемыми свойствами, включая повышенную стабильность, увеличенный период полужизни в сыворотке (см. Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337:525), а также связывание с рецепторами Fc, такими как неонатальный рецептор Fc (FcRn) (патенты США №№ 6086875, 6485726, 6030613; WO 03/077834; US2003-0235536A1).

[00222] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, «Fc-участок» включает аминокислотную последовательность Fc-домена или производную от Fc-домена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, Fc-участок содержит по меньшей мере один из шарнирного (например, верхний, средний и/или нижний шарнирный участок) домена (приблизительно аминокислоты 216-230 Fc-участка антитела в соответствии с нумерацией EU), домена CH2 (приблизительно аминокислоты 231-340 Fc-участка антитела в соответствии с нумерацией EU), домена CH3 (приблизительно аминокислоты 341-438 Fc-участка антитела в соответствии с нумерацией EU), домена CH4 или их варианта, части или фрагмента. В соответствии с другими вариантами осуществления, Fc-участок содержит полный домен Fc (т. е. шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, Fc-участок содержит, фактически состоит из или состоит из шарнирного домена (или его части), слитого с доменом CH3 (или его частью), шарнирного домена (или его части), слитого с доменом CH2 (или его частью), домена CH2 (или его части), слитого с доменом CH3 (или его частью), домена CH2 (или его части), слитого как с шарнирным доменом (или его частью), так и доменом CH3 (или его частью). В соответствии с еще одними вариантами осуществления, Fc-участок не имеет по меньшей мере части домена CH2 (например, весь или часть домена CH2). В соответствии с конкретным вариантом осуществления, Fc-участок содержит или состоит из аминокислот, соответствующих номерам 221-447 по EU.

[00223] Fc-домены, обозначаемые в настоящем документе F, F1 или F2, можно получить из ряда различных источников. В соответствии с одним вариантом осуществления, Fc-участок полипептида происходит из иммуноглобулина человека. Тем не менее, понятно, что Fc-участок может быть получен из иммуноглобулина другого вида млекопитающих, включая, например, виды грызуна (например, мышь, крысу, кролика, морскую свинку) или отличных от человека приматов (например, шимпанзе, макаки). Более того, полипептид Fc-доменов или их частей может быть получен из иммуноглобулинов любого класса, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и иммуноглобулина любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В соответствии с другим вариантом осуществления, применяют изотип IgG1 человека.

[00224] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вариант Fc привносит изменение по меньшей мере в одну эффекторную функцию, придаваемую Fc-участком, содержащим указанный Fc-домен дикого типа (например, улучшение или уменьшение способности Fc-участка связываться с рецепторами Fc (например, FcγRI, FcγRII или FcγRIII) или белками системы комплемента (например, C1q) или запускать антителозависимую цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз или комплементзависимую цитотоксичность (CDC). В соответствии с другими вариантами осуществления, вариант Fc характеризуется измененным методом инженерии цистеиновым остатком.

[00225] В Fc-участках по настоящему раскрытию могут быть использованы известные в настоящей области варианты Fc, о которых известно, что они вносят изменение (например, усиление или уменьшение) в эффекторную функцию и/или связывание с FcR. В частности, связывающая молекула по настоящему раскрытию может включать, например, изменение (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях, раскрытых в международных PCT-публикациях WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO04/044859, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2 и WO06/085967A2; патентных публикациях США №№ US2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US20070248603, US20070286859, US20080057056; или патентах США №№ 5648260; 5739277; 5834250; 5869046; 6096871; 6121022; 6194551; 6242195; 6277375; 6528624; 6538124; 6737056; 6821505; 6998253; 7083784;

7404956 и 7317091. В соответствии с одним вариантом осуществления, конкретное изменение (например, конкретная замена одной или нескольких аминокислот, известных из уровня техники) можно осуществить в одном или нескольких из раскрываемых аминокислотных положений. В соответствии с другим вариантом осуществления, в одном или нескольких из раскрываемых аминокислотных положений можно осуществить иное изменение (например, иную замену в одном или нескольких аминокислотных положениях, известных из уровня техники).

[00226] Fc-участок IgG можно модифицировать в соответствии с широко известными процедурами, такими как сайт-направленный мутагенез и др., с получением на выходе модифицированного IgG или Fc-фрагментов или их частей, которые будут связываться рецепторами Fc. Такие модификации включают модификации, которые находятся удаленно относительно от сайтов контакта с рецептором Fc, а также модификации в пределах сайтов контакта, которые сохраняют или даже усиливают связывание с рецепторами Fc. Например, без значительной потери аффинности связывания Fc с рецепторами Fc можно заменить следующие отдельные аминокислотные остатки в IgG1 Fc (Fc γ 1) человека: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A и K447A, где, например, P238A представляет собой пролин дикого типа, замененный на аланин в положении под номером 238. В качестве примера, конкретный вариант осуществления включает мутацию N297A, удаляющую высококонсервативный сайт N-гликозилирования. Аминокислоты дикого типа в указанных выше положениях можно заменить и на другие аминокислоты, а не только на аланин. В Fc можно ввести мутации, приводящие к образованию более чем ста Fc-участков, отличных от природного Fc. Кроме того, можно совместно ввести комбинации из двух, трех или более таких отдельных мутаций, что приведет к образованию сотен дополнительных Fc-участков. Более того, один Fc-участок конструкции по настоящему раскрытию может быть подвергнут мутации, а другой Fc-участок

конструкции вообще не подвергнут мутации, или они оба могут быть мутантными, но с разными мутациями.

[00227] Некоторые из вышеуказанных мутаций могут придавать Fc-участку новые функциональные возможности. Например, один вариант осуществления включает N297A, что удаляет высококонсервативный сайт N-гликозилирования. Результат данной мутации заключается в снижении иммуногенности, тем самым увеличивая период полужизни в кровотоке Fc-участка, и делая Fc-участок неспособным связываться с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIA без ущерба для аффинности (Routledge *et al.* 1995, Transplantation 60:847; Friend *et al.* 1999, Transplantation 68:1632; Shields *et al.* 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). В качестве дополнительного примера новой функциональности возможности, возникающей в результате описанных выше мутаций, в некоторых случаях аффинность к рецепторам Fc может увеличиваться свыше той, которая есть у дикого типа. Такая повышенная аффинность может отражаться увеличенной константой «ассоциации», уменьшенной константой «диссоциации» или как увеличенной константой «ассоциации», так и уменьшенной константой «диссоциации». Примеры мутаций, которые, как считается, придают повышенную аффинность к рецепторам Fc, включают без ограничения T256A, T307A, E380A и N434A (Shields *et al.* 2001, J. Biol. Chem. 276:6591).

[00228] Кроме того, по меньшей мере три гамма-рецептора Fc человека, судя по всему, распознают сайт связывания на IgG в нижнем шарнирном участке, обычно это аминокислоты 234-237. Следовательно, в результате мутаций в этом участке может возникнуть другой пример новой функциональной возможности и потенциального снижения иммуногенности, например, при замене аминокислот 233-236 «ELLG» IgG1 человека на соответствующую последовательность из IgG2 «PVA» (с делецией одной аминокислоты). Было показано, что при введении таких мутаций FcγRI, FcγRII и FcγRIII, которые опосредуют различные эффекторные функции, не будет связываться с IgG1. Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 and Armour *et al.* 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613.

[00229] В соответствии с одним вариантом осуществления, иммуноглобулиновый константный участок или его часть, например, Fc-участок, представляет собой полипептид, включающий последовательность PKNSSMISNTP (SEQ ID NO:98) и необязательно дополнительно включающий последовательность, выбранную из HQSLGTQ (SEQ ID NO:93), HQNLSDGK (SEQ ID NO:94), HQNISDGK (SEQ ID NO:95) или VISSHLGQ (SEQ ID NO:96) (патент США № 5739277).

[00230] В соответствии с определенными вариантами осуществления, иммуноглобулиновый константный участок или его часть являются полугликозилированными. Например, слитый белок, содержащий два Fc-участка или партнера связывания с FcRn, может содержать первый, гликозилированный, Fc-участок (например, гликозилированный участок CH2) и второй, агликозилированный, Fc-участок (например, агликозилированный участок CH2). В соответствии с одним вариантом осуществления, между гликозилированным и агликозилированным Fc-участками можно быть вставлен линкер. В соответствии с другим вариантом осуществления, Fc-участок или партнер по связыванию с FcRn полностью гликозилированы, т. е. гликозилированы все Fc-участки. В соответствии с другими вариантами осуществления, Fc-участок может быть агликозилирован, т. е. не гликозилирован ни один из фрагментов Fc.

[00231] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок по настоящему раскрытию содержит аминокислотную замену в иммуноглобулиновом константном участке или его части (например, вариантах Fc), которая изменяет антигензависимые эффекторные функции константного участка Ig, в частности, период полужизни белка в кровотоке.

[00232] Такие белки характеризуются повышенным или пониженным связыванием с рецептором Fc по сравнению с белками, не содержащими таких замен, и, следовательно, обладают увеличенным или уменьшенным периодом полужизни в сыворотке соответственно. Согласно ожиданиям, варианты Fc с улучшенной аффинностью к рецептору Fc будут иметь более длительные периоды полужизни в сыворотке крови, и такие молекулы имеют полезные применения в способах лечения млекопитающих, где требуется длительный период полужизни введенного полипептида, например, для лечения хронического заболевания или нарушения (см., например, патенты США №№ 7348004, 7404956 и 7862820). Напротив, согласно ожиданиям, варианты Fc со сниженной аффинностью связывания к рецептору Fc будут иметь более короткие периоды полужизни, и такие молекулы также полезны, например, для введения млекопитающим, где преимущественным может быть укороченное время пребывания в кровотоке, например, для диагностической визуализации *in vivo* или в ситуациях, когда исходный полипептид имеет токсические побочные эффекты, если он присутствует в кровотоке в течение продолжительных периодов времени. Варианты Fc со сниженной аффинностью связывания к рецептору Fc также с меньшей вероятностью проникают через плаценту и поэтому также пригодны при лечении заболеваний или нарушений у беременных.

женщин. Кроме того, другие задачи, при которых может требоваться пониженная аффинность связывания к рецептору Fc, включают такие задачи, при которых необходима локализация в головном мозге, почках и/или печени. В соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления, слитый белок по настоящему раскрытию характеризуется пониженным транспортом из сосудистой сети через эпителий почечных клубочков. В соответствии с другим вариантом осуществления, слитый белок по настоящему раскрытию характеризуется пониженным транспортом через гематоэнцефалический барьер (BBB) из головного мозга в сосудистое пространство. В соответствии с одним вариантом осуществления, белок с измененным связыванием рецептора Fc содержит по меньшей мере один Fc-участок (например, один или два Fc-участка), имеющие одну или несколько аминокислотных замен в «петле связывания рецептора Fc» константного участка Ig. Петля связывания рецептора Fc состоит из аминокислотных остатков 280-299 (согласно нумерации ЕС) полноразмерного Fc-участка дикого типа. В соответствии с другими вариантами осуществления, константный участок Ig или его часть по настоящему раскрытию, имеющие измененную аффинность связывания к рецептору Fc, содержит по меньшей мере один Fc-участок, имеющий одну или несколько аминокислотных замен в аминокислотном положении, соответствующем любому из следующих положений ЕС: 256, 277-281, 283-288, 303-309, 313, 338, 342, 376, 381, 384, 385, 387, 434 (например, N434A или N434K) и 438. Иллюстративные аминокислотные замены, которые изменяют активность связывания рецептора Fc, раскрыты в международной РСТ-публикации № WO05/047327.

2) Альбумин или его фрагмент или вариант

[00233] В соответствии с определенными вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент, связанный с полипептидом IL2 и/или ЕС-доменом IL2R α , представляет собой альбумин или его функциональный фрагмент.

[00234] Сывороточный альбумин человека (HSA или HA), белок из 609 аминокислот в его полноразмерной форме, отвечает за значительную часть осмотического давления сыворотки крови, а также функционирует как носитель эндогенных и экзогенных лигандов. Применяемый в контексте настоящего документа термин «альбумин» включает полноразмерный альбумин или его функциональный фрагмент, вариант, производное или аналог.

[00235] В соответствии с одним вариантом осуществления, слитый белок содержит полипептид IL2 и описываемый в настоящем документе ЕС-домен IL2R α , а также альбумин, его фрагмент или вариант, причем полипептид IL2 связан с альбумином или его фрагментом или вариантом. В соответствии с другим вариантом осуществления, слитый белок содержит полипептид IL2 и описываемый в настоящем документе ЕС-домен IL2R α , а также альбумин, его фрагмент или вариант, причем ЕС IL2 связан с альбумином или его фрагментом или вариантом.

[00236] В соответствии с другими вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент, связанный полипептидом IL2 и ЕС-доменом IL2R α , представляет собой альбумин или его фрагмент или вариант, который продлевает (или может продлить) период полужизни полипептида IL2 и ЕС-домена IL2R α . Дополнительные примеры альбумина или его фрагментов или их вариантов раскрыты в патентных публикациях США №№ 2008/0194481 A1, 2008/0004206 A1, 2008/0161243 A1, 2008/0261877 A1 или 2008/0153751 A1 либо в публикациях РСТ-заявок №№ 2008/033413 A2, 2009/058322 A1 или 2007/021494 A2.

3) Альбумин-связывающий фрагмент

[00237] В соответствии с определенными вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент, связанный с полипептидом IL2 и ЕС-доменом IL2R α , представляет собой альбумин-связывающий фрагмент, который содержит альбумин-связывающий пептид, бактериальный альбумин-связывающий домен, альбумин-связывающий фрагмент антитела или любые их комбинации. Например, альбумин-связывающий белок может представлять собой бактериальный альбумин-связывающий белок, антитело или фрагмент антитела, в том числе доменные антитела (см. патент США № 6696245). Альбумин-связывающий белок, например, может быть бактериальным альбумин-связывающим доменом, таким как домен из стрептококкового белка G (Konig, T. and Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* 218, 73-83). Другими примерами альбумин-связывающих пептидов, которых можно применять в качестве партнера по конъюгации, являются, например, пептиды с консенсусной последовательностью Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys, где Xaa₁ представляет собой Asp, Asn, Ser, Thr или Trp; Xaa₂ представляет собой Asn, Gln, His, Ile, Leu или Lys; Xaa₃ представляет собой Ala, Asp, Phe, Trp или Tyr; и Xaa₄ представляет собой Asp, Gly, Leu, Phe, Ser или Thr, как описано в заявке на выдачу патента США № 2003/0069395 или в публикации Dennis et al. (Dennis et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 35035-35043).

4) Последовательность PAS

[00238] В соответствии с другими вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент, связанный с полипептидом IL2 и ЕС-доменом IL2R α , представляет собой последовательность PAS. В соответствии с одним вариантом осуществления, слитый белок содержит описываемые в настоящем документе полипептид IL2 и ЕС-домен IL2R α , а также последовательность PAS, причем полипептид IL2 и/или ЕС-домен IL2R α связаны с последовательностью PAS.

[00239] В контексте настоящего документа последовательность PAS означает аминокислотную последовательность, содержащую преимущественно остатки аланина и серина или содержащую преимущественно остатки аланина, серина и пролина, при этом такая аминокислотная последовательность при физиологических условиях формирует случайную спиральную конформацию. Соответственно, последовательность PAS представляет собой структурный элемент, аминокислотный полимер или кассету последовательностей, содержащую, фактически состоящую из или состоящую из аланина, серина и пролина, которую можно применять в качестве части гетерологичного фрагмента в слитом белке. При этом специалисту в настоящей области техники известно, что аминокислотный полимер также может формировать случайную спиральную конформацию при внесении в последовательность PAS остатков, отличных от аланина, серина, и пролина, в качестве второстепенного компонента. Термин «второстепенный компонент» в контексте настоящего документа означает, что аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, можно внести в последовательность PAS до определенной степени, например, до приблизительно 12%, т. е. приблизительно 12 из 100 аминокислот в последовательности PAS, до приблизительно 10%, т. е. приблизительно 10 из 100 аминокислот в последовательности PAS, до приблизительно 9%, т. е. приблизительно 9 из 100 аминокислот, до приблизительно 8%, т. е. приблизительно 8 из 100 аминокислот, приблизительно 6%, т. е. приблизительно 6 из 100 аминокислот, приблизительно 5%, т. е. приблизительно 5 из 100 аминокислот, приблизительно 4%, т. е. приблизительно 4 из 100 аминокислот, приблизительно 3%, т. е. приблизительно 3 из 100 аминокислот, приблизительно 2%, т. е. приблизительно 2 из 100 аминокислот, приблизительно 1%, т. е. приблизительно 1 из 100 аминокислот. Аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, можно выбрать из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr и Val.

[00240] В физиологических условиях участок последовательности PAS формирует случайную спиральную конформацию и благодаря ей может опосредовать повышенную *in vivo* и/или *in vitro* стабильность полипептида IL2. Поскольку домен со случайной спиральной конформацией не принимает стабильную структуру или функцию сам по себе, фактически сохраняется биологическая активность, опосредованная полипептидом IL2 и ЕС-доменом IL2R α , с которым он слит. В соответствии с другими вариантами осуществления, последовательности PAS, которые образуют домен со случайной спиральной конформацией, являются биологически инертными, особенно в отношении протеолиза в плазме крови, иммуногенности, изоэлектрической точки/электростатического поведения, связывания с рецепторами на поверхности клетки или интернализации, но при этом все еще являются биоразлагаемыми, что обеспечивает явные преимущества над синтетическими полимерами, такими как ПЭГ.

[00241] Неограничивающие примеры последовательностей PAS, образующих конформацию случайной спирали, включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO:85), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO:86), APSSPSPSAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO:87), APSSPSPSAPSSPSPASPS (SEQ ID NO:88), SSPSAPSPSSPASPSPSSPA (SEQ ID NO:89), AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO:90) и ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO:91), или любые их комбинации. Дополнительные примеры последовательностей PAS известны, например, из патентной публикации США № 2010/0292130 A1 и PCT-заявки № WO 2008/155134 A1.

5) Последовательность НАР

[00242] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент связанный с полипептидом IL2 и ЕС-доменом IL2R α , представляет собой богатый глицином гомо-аминокислотный полимер (НАР). Последовательность НАР может включать повторяющуюся последовательность глицина, которая имеет длину по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 100 аминокислот, 120 аминокислот, 140 аминокислот, 160 аминокислот, 180 аминокислот, 200 аминокислот, 250 аминокислот, 300 аминокислот, 350 аминокислот, 400 аминокислот, 450 аминокислот или 500 аминокислот. В соответствии с одним вариантом осуществления, последовательность НАР способна продлевать период полужизни фрагмента, слитого или связанного с последовательностью

НАР. Неограничивающие примеры последовательности НАР включают без ограничения $(\text{Gly})_n$, $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ или $\text{S}(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В соответствии с одним вариантом осуществления, n равно 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40. В соответствии с другим вариантом осуществления, n равно 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200.

б) Трансферрин или его фрагмент

[00243] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент, связанный с полипептидом IL2 и ЕС-доменом IL2R α , представляет собой трансферин или его фрагмент. Для получения слитых белков по настоящему раскрытию можно использовать любой трансферрин. В качестве примера, Tf (Tf) дикого типа человека представляет собой 679-аминокислотный белок массой примерно 75 кДа (без учета гликозилирования) с двумя основными доменами: N (приблизительно 330 аминокислот) и C (приблизительно 340 аминокислот), которые, по-видимому, являются следствием дубликации гена. См. записи под регистрационными номерами в GenBank: NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM 039847 и S95936 (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Трансферрин состоит из двух доменов, т. е. домена N и домена C. N-домен состоит из двух субдоменов, таких как домен N1 и домен N2, и C-домен состоит из двух субдоменов, таких как домен C1 и домен C2.

[00244] В соответствии с одним вариантом осуществления, трансферриновая часть слитого белка включает сплайс-вариант трансферрина. В одном примере сплайс-вариант трансферрина может быть сплайс-вариантом трансферрина человека, например, под регистрационным номером Genbank AAA61140. В соответствии с другим вариантом осуществления, трансферриновая часть гибридного белка включает один или несколько доменов трансферриновой последовательности, например, домен N, домен C, домен N1, домен N2, домен C1, домен C2 или любые их комбинации.

7) Полимер, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ)

[00245] В соответствии с другими вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент, присоединенный к полипептиду IL2 и ЕС-домену IL2R α , представляет собой растворимый полимер, известный в настоящей области техники, в том числе без ограничений полиэтиленгликоль, сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу,

декстран или поливиниловый спирт. Гетерологичный фрагмент, такой как растворимый полимер, может быть присоединен к любым положениям в полипептиде IL2, или в ЕС-домене IL2R α либо на N-, либо на C-конце.

[00246] Также настоящим раскрытием предусмотрены химически модифицированные производные слитого белка по настоящему раскрытию, которые могут обеспечить дополнительные преимущества, такие как повышенная растворимость, стабильность и время нахождения в кровотоке полипептида или пониженная иммуногенность (см. патент США № 4179337). Химические фрагменты для модификации могут быть выбраны из группы, состоящей из водорастворимых полимеров, включая без ограничения полиэтиленгликоль, сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран и поливиниловый спирт. Слитый белок может быть модифицирован в случайных положениях внутри молекулы, или на N- или C-конце, или в заранее определенных положениях внутри молекулы и может включать один, два, три или более присоединенных химических фрагментов.

[00247] Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. В случае полиэтиленгликоля, в соответствии с одним вариантом осуществления, молекулярная масса составляет от приблизительно 1 кДа до приблизительно 100 кДа для простоты обращения и производства. Можно использовать и другие размеры, в зависимости от требуемого профиля (например, длительности требуемого замедленного высвобождения, эффектов, если таковые имеются, оказываемых на биологическую активность, простоту обращения, степень или отсутствие антигенности, и других известных эффектов полиэтиленгликоля, оказываемых на белок или аналог). Например, полиэтиленгликоль может иметь среднюю молекулярную массу приблизительно 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 10500, 11000, 11500, 12000, 12500, 13000, 13500, 14000, 14500, 15000, 15500, 16000, 16500, 17000, 17500, 18000, 18500, 19000, 19500, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000 или 100000 кДа.

[00248] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полиэтиленгликоль может иметь разветвленную структуру. Разветвленные полиэтиленгликоли описаны, например, в патенте США № 5643575; Morpurgo *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56:59-72 (1996); Vorobjev *et al.*, *Nucleosides Nucleotides* 18:2745-2750 (1999); и Caliceti *et al.*, *Bioconj. Chem.* 10:638-646 (1999).

[00249] Также может варьировать количество полиэтиленгликолевых фрагментов, присоединенных к каждому слитому белку, полипептиду IL2 или ЕС-домену IL2R α по настоящему раскрытию (т. е. степень замещения). Например, пегилированные белки по настоящему раскрытию могут быть связаны в среднем с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20 или более молекулами полиэтиленгликоля. Аналогичным образом, средняя степень замещения находится в пределах таких диапазонов, как 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19 или 18-20 полиэтиленгликолевых фрагментов на молекулу белка. Способы определения степени замещения рассмотрены, например, в публикации Delgado *et al.*, *Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys.* 9:249-304 (1992).

[00250] В соответствии с другими вариантами осуществления, полипептид IL2 и ЕС-домен IL2R α , в контексте настоящего раскрытия, конъюгированы с одним или несколькими полимерами. Полимер может быть водорастворимым и ковалентно или нековалентно присоединенным к полипептиду IL2, ЕС-домену IL2R α или другим фрагментам, конъюгированным с полипептидом IL2 или ЕС-доменом IL2R α . Неограничивающими примерами полимера могут быть поли(алкиленоксид), поли(винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиоксазолин или поли(акрилоилморфолин).

8) Гидроксиэтилкрахмал (HES)

[00251] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент, связанный с полипептидом IL2 и ЕС-доменом IL2R α , представляет собой полимер, например, гидроксиэтилкрахмал (HES) или его производное. В соответствии с одним вариантом осуществления, слитый белок содержит описываемый в настоящем документе полипептид IL2 и HES, причем полипептид IL2 и ЕС-домен IL2R α связаны с HES.

[00252] Гидроксиэтилкрахмал (HES) является производным встречающегося в природе амилопектина и в организме расщепляется альфа-амилазой. HES является замещенным производным углеводного полимера амилопектин, который присутствует в кукурузном крахмале в концентрации до 95% по массе. HES обладает полезными биологическими свойствами, и его применяют в качестве средства для замены объема крови и при гемодилюционной терапии в клиниках (Sommermeyer *et al.*, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278 (1987); и Weidler *et al.*, *Arzneim.-Forschung/Drug Res.*, 41, 494-498 (1991)).

[00253] Амилопектин содержит глюкозные фрагменты, в которых в основной цепи присутствуют альфа-1,4-гликозидные связи, а в сайтах разветвления обнаруживаются

альфа-1,6-гликозидные связи. Физико-химические свойства данной молекулы в основном определяются типом гликозидных связей. Из-за разорванной альфа-1,4-гликозидной связи образуются спиральные структуры с приблизительно шестью мономерами глюкозы на виток. Физико-химические, а также биохимические свойства полимера можно модифицировать путем замещения. Введение гидроксильной группы можно осуществить путем щелочного гидроксэтилирования. Путем адаптации условий реакции можно использовать различную реакционную способность соответствующей гидроксигруппы в незамещенном мономере глюкозы по отношению к гидроксэтилированию. Благодаря этому специалист в настоящей области техники может в ограниченной степени влиять на характер замещения.

[00254] HES в основном характеризуется распределением молекулярной массы и степенью замещения. Степень замещения, обозначенная как DS, относится к молярному замещению и известна специалистам в настоящей области техники. См. публикацию Sommermeyer *et al.*, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278 (1987), которая упомянута выше, в частности на странице 273.

[00255] В соответствии с одним вариантом осуществления, гидроксэтилкрахмал имеет среднюю молекулярную массу (среднее значение массы) от 1 до 300 кДа, от 2 до 200 кДа, от 3 до 100 кДа или от 4 до 70 кДа. Гидроксэтилкрахмал может дополнительно иметь молярную степень замещения от 0,1 до 3, предпочтительно от 0,1 до 2, более предпочтительно от 0,1 до 0,9, предпочтительно 0,1 до 0,8, и соотношение между замещением C2:C6 в диапазоне от 2 до 20 по отношению к гидроксэтильным группам. Неограничивающим примером HES со средней молекулярной массой приблизительно 130 кДа является HES со степенью замещения от 0,2 до 0,8, такой как 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 или 0,8, предпочтительно от 0,4 до 0,7, такой как 0,4, 0,5, 0,6 или 0,7. В соответствии с конкретным вариантом осуществления, примером HES со средней молекулярной массой приблизительно 130 кДа является VOLUVEN® от компании Fresenius. VOLUVEN® представляет собой искусственный коллоид, используемый, например, для восполнения используемого объема при терапевтических показаниях для лечения и профилактики гиповолемии. Характеристиками VOLUVEN® являются следующие: средняя молекулярная масса 130000+/-20000 Да, молярное замещение 0,4 и соотношение C2:C6 приблизительно 9:1. В соответствии с другими вариантами осуществления, диапазонами средней молекулярной массы гидроксэтилкрахмала являются, например, 4-70 кДа, или 10-70 кДа, или 12-70 кДа, или 18-70 кДа, или 50-70 кДа, или 4-50 кДа, или 10-50 кДа, или 12-50 кДа, или 18-50 кДа, или 4-18 кДа, или 10-18 кДа, или 12-18 кДа, или 4-12 кДа, или 10-12 кДа, или 4-

10 кДа. В соответствии с еще одними вариантами осуществления, средняя молекулярная масса используемого гидроксиэтилкрахмала находится в диапазоне от более 4 кДа и менее 70 кДа, таком как приблизительно 10 кДа, или в диапазоне от 9 до 10 кДа, или от 10 до 11 кДа, или от 9 до 11 кДа, или приблизительно 12 кДа, или в диапазоне от 11 до 12 кДа, или от 12 до 13 кДа, или от 11 до 13 кДа, или приблизительно 18 кДа, или в диапазоне от 17 до 18 кДа, или от 18 до 19 кДа, или от 17 до 19 кДа, или приблизительно 30 кДа, или в диапазоне от 29 до 30, или от 30 до 31 кДа, или приблизительно 50 кДа, или в диапазоне от 49 до 50 кДа, или от 50 до 51 кДа, или от 49 до 51 кДа.

[00256] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент может представлять собой смеси разновидностей гидроксиэтилкрахмала, имеющих различные средние значения молекулярной массы, и/или различные значения степени замещения, и/или различные соотношения замещения C2:C6. Следовательно, можно использовать смеси разновидностей гидроксиэтилкрахмала, имеющие различные средние значения молекулярной массы и различные значения степени замещения, а также различные соотношения замещения C2:C6, или имеющие различные средние значения молекулярной массы и различные значения степени замещения, а также одинаковое или приблизительно одинаковое соотношение замещения C2:C6, или имеющие различные средние значения молекулярной массы и одинаковые или приблизительно одинаковые значения степени замещения, а также различные соотношения замещения C2:C6, или имеющие одинаковые или приблизительно одинаковые среднюю значения молекулярной массы и различные значения степени замещения, а также различные соотношения замещения C2:C6, или имеющие различные средние значения молекулярной массы и одинаковые или приблизительно одинаковые значения степени замещения, а также одинаковое или приблизительно одинаковое соотношение замещения C2:C6, или имеющие одинаковые или приблизительно одинаковые средние значения молекулярной массы и различные значения степени замещения, а также одинаковое или приблизительно одинаковое соотношение замещения C2:C6, или имеющие одинаковые или приблизительно одинаковые средние значения молекулярной массы и приблизительно одинаковые значения степени замещения, а также различные соотношения замещения C2:C6, или имеющие приблизительно одинаковые средние значения молекулярной массы и приблизительно одинаковые значения степени замещения, а также приблизительно одинаковое соотношение замещения C2:C6.

9) Полисиаловые кислоты (PSA)

[00257] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, неполипептидный гетерологичный фрагмент, связанный с полипептидом IL2 и/или ЕС-доменом IL2R α , представляет собой полимер, например, полисиаловые кислоты (PSA) или их производное. Полисиаловые кислоты (PSA) представляют собой природные неразветвленные полимеры сиаловой кислоты, продуцируемые определенными бактериальными штаммами и млекопитающими в определенных клетках Roth J., et al. (1993) в *Polysialic Acid: From Microbes to Man*, eds Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland), pp 335–348. Их можно получить с различной степенью полимеризации от n = приблизительно 80 или более остатков сиаловой кислоты до n = 2 путем ограниченного кислотного гидролиза или расщепления нейраминидазами или путем фракционирования природных бактериальных форм полимера. Состав различных полисиаловых кислот также варьирует, так что существуют гомополимерные формы, т. е. альфа-2,8-связанная полисиаловая кислота, входящая в состав капсульного полисахарида штамма K1 *E. coli* и менингококков группы В, которая также встречается на эмбриональной форме молекулы адгезии нейронов (N-CAM). Также существуют гетерополимерные формы, такие как чередующаяся альфа-2,8-альфа-2,9-полисиаловая кислота штамма K92 *E. coli* и полисахариды группы С *N. meningitidis*. Сиаловая кислота также может встречаться в чередующихся сополимерах с мономерами, отличными от сиаловой кислоты, такими как группа W135 или группа Y *N. meningitidis*. Полисиаловые кислоты выполняют важные биологические функции, включая уклонение от иммунной системы и системы комплемента патогенными бактериями и регуляцию глиальной адгезии незрелых нейронов во время внутриутробного развития (при этом полимер выполняет антиадгезивную функцию) Cho and Troy, *P.N.A.S., USA*, 91 (1994) 11427-11431, хотя у млекопитающих нет известных рецепторов полисиаловых кислот. Альфа-2,8-связанная полисиаловая кислота штамма K1 *E. coli* также известна как «коломиновая кислота», и ее используют (при различных значениях длины) для иллюстрации настоящего раскрытия. Были описаны различные способы присоединения или конъюгирования полисиаловых кислот к полипептиду, например, см. патент США № 5846951; публикации WO-A-0187922 и US 2007/0191597 A1.

10) Последовательности XTEN

[00258] Применяемый в контексте настоящего документа термин «последовательность XTEN» относится к полипептидам увеличенной длины с не встречающимися в природе, практически не повторяющимися последовательностями, которые состоят в основном из небольших гидрофильных аминокислот, при этом такая последовательность в физиологических условиях имеет вторичную или третичную структуры с низкой степенью завершенности или вообще не имеет вторичной или третичной структуры. В качестве партнера слитого белка XTEN могут служить в качестве носителя, придавая определенные требуемые фармакокинетические, физико-химические и фармацевтические свойства, если их связать с полипептидом IL2 и/или ЕС-доменом IL2Ra по настоящему раскрытию для создания слитого белка. К таким требуемым свойствам относятся без ограничения улучшенные фармакокинетические параметры и характеристики растворимости.

[00259] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, последовательность XTEN по настоящему раскрытию представляет собой пептид или полипептид, имеющий более приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 или 2000 аминокислотных остатков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, XTEN представляет собой пептид или полипептид, имеющий от более приблизительно 20 до приблизительно 3000 аминокислотных остатков, от более 30 до приблизительно 2500 остатков, от более 40 до приблизительно 2000 остатков, от более 50 до приблизительно 1500 остатков, от более 60 до приблизительно 1000 остатков, от более 70 до приблизительно 900 остатков, от более 80 до приблизительно 800 остатков, от более 90 до приблизительно 700 остатков, от более 100 до приблизительно 600 остатков, от более 110 до приблизительно 500 остатков или от более 120 до приблизительно 400 остатков.

[00260] Последовательность XTEN по настоящему раскрытию может содержать один или несколько мотивов последовательности из 9-14 аминокислотных остатков или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную мотиву последовательности, причем мотив содержит, фактически состоит или состоит из аминокислот 4-6 типов, выбранных из группы, состоящей из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P). См. публикацию US 2010-0239554 A1.

[00261] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, последовательность XTEN содержит несколько единиц неперекрывающихся мотивов последовательности из семейства мотивов AD, или семейства мотивов AE, или семейства мотивов AF, или семейства мотивов AG, или семейства мотивов AM, или семейства мотивов AQ, или семейства BC, или семейства BD, с получаемой в результате XTEN, которая характеризуется определенным диапазоном гомологии. В соответствии с другими вариантами осуществления, XTEN содержит множественные единицы последовательностей-мотивов из двух или более семейств мотивов. Такие последовательности можно подобрать для достижения требуемых физических/химических характеристик, включая такие свойства, как результирующий заряд, гидрофильность, отсутствие вторичной структуры или отсутствие повторяемости, которые придаются аминокислотным составом мотивов, как более подробно описано ниже. В соответствии с другими вариантами осуществления, мотивы, включенные в XTEN, могут быть подобраны и собраны с помощью описанных в настоящем документе способов с получением XTEN длиной от приблизительно 36 до приблизительно 3000 аминокислотных остатков.

[00262] В соответствии с дополнительными вариантами осуществления, применяемая в настоящем раскрытии XTEN влияет на физические или химические свойства, например, фармакокинетику слитого белка по настоящему раскрытию. Последовательность XTEN в контексте настоящего раскрытия может характеризоваться одним или несколькими из следующих полезных свойств: конформационная гибкость, повышенная растворимость в воде, высокая степень устойчивости к протеазам, низкая иммуногенность, низкое связывание с рецепторами млекопитающих или увеличенные гидродинамические (или стоксовы) радиусы. В соответствии с конкретным вариантом осуществления, последовательность XTEN, связанная с полипептидом IL2 и/или ЕС-доменом IL2R α , в настоящем раскрытии увеличивает такие фармакокинетические свойства, как более длительный конечный период полужизни или увеличенная площадь под кривой (AUC), так что описываемый в настоящем документе слитый белок сохраняется *in vivo* в течение увеличенного периода времени по сравнению с полипептидом IL2 дикого типа. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления, последовательность XTEN в контексте настоящего раскрытия увеличивает такие фармакокинетические свойства, как более длительный конечный период полужизни или увеличенная площадь под кривой (AUC), так что полипептид IL2 сохраняется *in vivo* в течение увеличенного периода времени по сравнению с IL2 дикого типа.

[00263] Для определения физических/химических свойств белков, содержащих последовательность XTEN, можно использовать ряд способов и анализов. К таким способам относятся без ограничения аналитическое центрифугирование, EPR, ионообменная ВЭЖХ, эксклюзионная ВЭЖХ, обращенно-фазовая ВЭЖХ, светорассеяние, капиллярный электрофорез, круговой дихроизм, дифференциальная сканирующая калориметрия, флуоресценция, ионообменная ВЭЖХ, эксклюзионная ВЭЖХ, ИК-спектроскопия, ЯМР, спектроскопия комбинационного рассеяния, рефрактометрия и спектроскопия в УФ/видимом спектре. Дополнительные способы описаны в публикации Amau *et al.*, *Prot Expr and Purif* 48, 1-13 (2006).

[00264] Дополнительные примеры последовательностей XTEN, которые можно применять в соответствии с настоящим раскрытием, раскрыты в патентных публикациях США №№ 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 или 2011/0172146 A1 или международных патентных публикациях №№ WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1 или WO 2011028344 A2.

11) Иммуноглобулин-связывающий пептид (или полипептид)

[00265] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, негетерологичный фрагмент, связанный с полипептидом IL2 и/или ЕС-доменом IL2R α , представляет собой иммуноглобулин-связывающий пептид. Иммуноглобулин-связывающие пептиды могут связываться с Fc-участком и могут увеличивать период полужизни описываемого в настоящем документе слитого белка.

[00266] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммуноглобулин-связывающий пептид, пригодный для настоящего раскрытия, представляет собой пептид или полипептид, имеющий более приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 аминокислотных остатков.

[00267] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, иммуноглобулин-связывающий пептид, пригодный для настоящего раскрытия, содержит 13-мономерный IgG-Fc-домен-связывающий пептид (IgGBP). DeLano WL, et al. (2000) *Science* 287:1279–1283. В соответствии с другими вариантами осуществления, иммуноглобулин-связывающий пептид, пригодный для настоящего раскрытия, содержит пептиды, раскрытые в

патентной публикации США № 20170334954, патентной публикации США № 20170210777 или PCT-публикации № WO/2017/069158.

7.3.5 Слитый белок

[00268] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитые белки содержат любую из последовательностей под SEQ ID NO:13 - SEQ ID NO:70 и под SEQ ID NO:202 - SEQ ID NO:204, которые указаны в таблице 3.

Таблица 3

SEQ ID NO:	Конструкция	Последовательность
204	IL2(21-153)- (G3S)3-CD25(22-240)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAA TMETSIFTTEYQ
13	IL2(C145S)- CD25(22-240)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAA TMETSIFTTEYQ
14	IL2(C145A)- CD25(22-240)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN

		INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAA TMETSIFTTEYQ
15	IL2(C145V)- CD25(22-240)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFVQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAA TMETSIFTTEYQ
16	IL2-CD25(22- 212)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
17	IL2-CD25(22- 187)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE

18	IL2(C145A)- CD25(C213S, 22-240)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSSLVTTTDFQIQTEMAA TMETSIFTTEYQ
19	HSA-(G ₄ S) ₃ - IL2-CD25(22-187)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKLVN EVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMA DCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEE TFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLS QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAAD FVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKT YETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQONLIKQNCELFE QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKH PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNR RPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTA LVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEG KKLVAAASQAALGLGGGGSGGGSGGGGS APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTL TGGGSGGGSGGGGS ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYM LCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPREEQKERKTTEM QSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCV QGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE

20	IL2(C145A)- CD25(22-212)- GG-HSA	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTL TGGGSGGGSGGGG ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYM LCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEM QSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCV QGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEE KPQASPEGRPESETSGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAF AQYLQQAPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFG DKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRL VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASL QKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCH GDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIA EVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYA RRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKFP LVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTL VEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT PVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHA DICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV EKCKKADDKETCFAEEGKKLVAAASQAALGL
21	IL2(C145A)- CD25(22-192)- GGC	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQGGC
22	IL2(C145A)- CD25(22-213)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN

		INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF A QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESET S C
23	IL2(C145A)- CD25(22-187, N70C)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF A QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTG C SSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE
24	IL2(C145A)- CD25(22-187, N89C)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF A QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATR C TTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE
25	IL2(C145A)- CD25(22-187)-C	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF A QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE C
26	Человеческий Fc1.1(f)-AZ1-	DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV

	IL2(C145S)- CD25(22-187)-G первая сторона Fc для получения в гетеродимерной форме	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYVYP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGAAPTSSSTKKTKQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLT RMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIISTLTGGGSGGGSGGGSEL CDDDPPEI PHATFKAMAYKEGT MLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATR N TTKQVTPQP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLP GHCREPPPWEN EATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRW TQPQLICTGEG
27	IL2(C145S)- CD25(22-187)- HuFc1.1(f)-AZ1 первая сторона Fc для получения в гетеродимерной паре	APTSSSTKKTKQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS N INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGGSGGGSGGGSEL CDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLP GHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTP EVT CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPRE PQVYVYP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
29	IL2-C145S- CD25(22-187)	APTSSSTKKTKQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS N INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGGSGGGSGGGSEL CDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QP EEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLP GHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE

30	IL2-T23A-C145S-CD25(22-187)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE
31	IL2-CD25(22-240)-C213S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSSLVTTTDFQIQTEMAA TMETSIFTTEYQ
32	IL2-T23A-C145S-CD25(22-240)-C213S	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSSLVTTTDFQIQTEMAA TMETSIFTTEYQ
33	NativeSigPep-IL2-CD25(22-187)	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIP HATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQAS

		LPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPA ESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE
34	NativeSigPep- HuIL2-CD25(22- 212)-PP	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIP HATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQAS LPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPA ESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPE SETSP
35	M-IL2(C145S)- CD25(C213S)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF S QSIIST LTGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCEC KRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVT QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLI CTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS SL VTTTDFQIQTEMA ATMETSIFTTEYQ
36	M-IL2(C145S)- CD25(C213S)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF S QSIIST LTGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCEC KRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVT QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLI CTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS SL VTTTDFQIQTEMA ATMETSIFTTEYQ
37	M-IL2-C145A- CD25(22-212)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF A QSIIST

		LTGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCEC KRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVT PQPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLI CTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
38	M-IL2-C145A- CD25(22-212)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF A QSIIST LTGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCEC KRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVT PQPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERI YHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLI CTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
39	Del-A21-IL2- CD(22-212)	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF C QSIISTLT GGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKR GFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQ PEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYH FVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT GEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
40	IL2-T23A-L2- CD25(22-212)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF C QSIISTL TGGSSGGAGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
41	IL2-T3A-L3- CD(22-212)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF C QSIISTL

		TGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEG TMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATR NTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWE NEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTR WTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
43	IL2-T23A- C145S-CD25(22- 187)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE
44	IL2-T23A- C145S-CD25(22- 240)-C213S	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSSLVTTTDFQIQTEMAA TMETSIFTTEYQ
45	IL2-T23A- CD25(22-187)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE

46	IL2-T23A- CD25(22-212)- T106A	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKATEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
47	IL2-T23A- CD25(22-212)- T95A	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVAP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
49	IL2-T23A- CD25(22-212)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
50	IL2-T23A- C145S-CD25(22- 212)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS

51	IL2-C145S- CD25(22-212)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF S QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
52	IL2-T23A- CD25(22-212, T95A-T105A)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF C QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVAP QPREEQKERKATEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
53	IL2-T23A- CD25(22-212)- PG	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF C QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSPG
54	IL2-CD25(22- 187)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF C QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE

55	IL2-T23A-C145S-CD25(22-187)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF S QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE
56	IL2-CD25(22-240, C213S)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF C QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSSLVTTTDFQIQTEMAA TMETSIFTTEYQ
57	Del-A21-IL2-CD(22-212)	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF C QSIISTLT GGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKR GFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQ PEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYH FVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT GEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
58	IL2-T23A-L2-CD25(22-212)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF C QSIISTL TGGSSGGAGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC

		TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
59	IL2-T23A-L3- CD25(22-212)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF C QSIISTL TGGGSGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEG TMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATR NTTKQVTPQPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW NEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTR WTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
60	IL2-T23A- C145S-CD25(22- 187)-N70Q-N89Q	AP A SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF S QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTG Q SSHSSWDNQCQCTSSATR Q TTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE
61	IL2-C145S- CD25(22-187)- N70Q-N89Q	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF S QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTG Q SSHSSWDNQCQCTSSATR Q TTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE
62	IL2-T23A - C145S-CD25(22- 187)-N89Q	AP A SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF S QSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATR Q TTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC

		TGE
63	IL2-T23A - C145S-CD25(22-187)-N70Q	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGQSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE
64	IL2-C145S- CD25(22-187)- N89Q	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRQTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE
65	IL2-C145S- CD25(22-187)- N70Q	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGQSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE
66	IL2-T23A - C145S-CD25(22-187)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPREEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC

		TGE
67	Fc1.1-linker- IL2-CD25(22- 212) Даёт Fc- гомономер	DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGSGGGGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
68	IL2-CD25(22- 212)-Fc1.1 Даёт Fc- гомономер	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
69	IL2(V111K)- CD25(22-212)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP

		QPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
70	IL2(D40T)- CD25(22-212)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLTLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTP QPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS
202	IL2-T3A- CD25(22-187)- N89Q-T95A- T106A	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL TGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRQTTKQVAP QPEEQKERKATEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIY HFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TGE
203	Fc- (IL2(V91K)CD25)2, двухвалентная	DKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGSGGGSGGAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNY KNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFCQSIISTLTGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAM AYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCT SSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCRE PPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMT HGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETS

[00269] IL2 представляет собой зрелый (IL2(21-153), если не указано иное. Линкер между IL2 и CD25 представляет собой (G3S)3, если не указано иное.

[00270] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок по настоящему раскрытию содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична любой из последовательностей под SEQ ID NO:13 - SEQ ID NO:70 и под SEQ ID NO:202 - SEQ ID NO:204.

[00271] Слитый белок IL2-IL2R α по настоящему раскрытию может иметь одну или несколько из следующих свойств/активностей: (1) повышение активности регуляторных Т-клеток (Treg) и/или повышение иммунологической толерантности при терапии с помощью низких доз IL2; (2) повышение иммунного ответа и памяти при терапии более высокими дозами; (3) увеличение доступности IL2 по сравнению с рекомбинантным IL2; и/или (4) увеличение стойкой стимуляции посредством IL2 лимфоцитов, несущих IL2R, *in vivo*.

[00272] В соответствии с одним вариантом осуществления, раскрываемые в настоящем документе слитые белки обладают одним или несколькими фармакокинетическими свойствами, выбранными из группы, состоящей из увеличенного периода полужизни, повышенной C_{max} , увеличенной AUC, повышенной C_{min} , пониженного клиренса, улучшенной биодоступности и любой их комбинации, по сравнению с фармакокинетическим свойством полипептида, состоящего из последовательности IL2 (SEQ ID NO:2) или последовательности под SEQ ID NO:204 (последовательности IL2-CD25 дикого типа с 12-мономерным линкером без укорочения).

[00273] В соответствии с одним вариантом осуществления, раскрываемые в настоящем документе слитые белки имеют удлиненный период полужизни по сравнению с IL2 (SEQ ID NO:2) или последовательностью под SEQ ID NO:204 (последовательностью IL2-CD25 дикого типа с 12-мономерным линкером без укорочения). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, удлиненный период полужизни по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 6 раз, по меньшей мере приблизительно в 7 раз, по меньшей мере

мере приблизительно в 8 раз, по меньшей мере приблизительно в 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по меньшей мере приблизительно в 11 раз, по меньшей мере приблизительно в 12 раз, по меньшей мере приблизительно в 13 раз, по меньшей мере приблизительно в 14 раз, по меньшей мере приблизительно в 15 раз, по меньшей мере приблизительно в 16 раз, по меньшей мере приблизительно в 17 раз, по меньшей мере приблизительно в 18 раз, по меньшей мере приблизительно в 19 раз, по меньшей мере приблизительно в 20 раз, по меньшей мере приблизительно в 21 раз или по меньшей мере приблизительно в 22 раз больше по сравнению с периодом полужизни полипептида, состоящего из последовательности IL2 (SEQ ID NO:2) или последовательности под SEQ ID NO:204 (последовательности IL2-CD25 дикого типа с 12-мономерным линкером без укорочения).

[00274] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, повышенную активность Treg, которая является результатом воздействия слитого белка IL2/IL2R α , можно проанализировать различными способами, включая, например, (1) повышенную представленность и повышенное количество Treg в компартменте CD4⁺ Т-клеток; (2) положительную регуляцию IL2-зависимого CD25; (3) повышенную пролиферацию, оцениваемую по экспрессии пролиферативного маркера Ki67; и (4) увеличенную долю IL2-зависимой полностью дифференцированной субпопуляции Klr α 1⁺ Treg. Такие эффекты, оказываемые на Treg, можно наблюдать, например, в селезенке и/или воспаленной поджелудочной железе.

[00275] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок IL2/IL2R α по настоящему раскрытию увеличивает количество толерогенных и иммуносупрессивных клеток Treg и иммунитет за счет увеличения ответов с участием Т-эффекторных/клеток памяти, а в соответствии с дополнительными вариантами осуществления, он обладает улучшенной фармакокинетикой за счет формирования таких ответов при (1) более низких эффективных уровнях активности IL2 по сравнению с природным или рекомбинантным IL2; и/или (2) вызывает более стойкие биологические ответы, чем природный или рекомбинантный IL2.

[00276] В соответствии с конкретными вариантами осуществления, слитый белок обладает улучшенной активностью по сравнению с природным или рекомбинантным IL2. Например, эффект, оказываемый слитым белком IL2/IL-2R α , может заключаться в увеличении количества толерогенных клеток Treg приблизительно в 2 раз, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40

раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз или в более низком эффективном уровне активности IL2 по сравнению с природным или рекомбинантным IL2. В соответствии с другими вариантами осуществления, слитый белок L2/IL2Ra является более эффективным, чем природный или рекомбинантный IL2, при индукции стойкого увеличения количества клеток Treg и связанных с этим свойств.

[00277] Для создания представленных в настоящем документе слитых белков IL2/внеклеточного домена IL2Ra можно применять различные фрагменты и варианты IL2 и IL2Ra из различных организмов. Такие компоненты более подробно рассмотрены в других разделах настоящего документа. Примеры неограничивающих непроцессированных или зрелых слитых белков IL2/внеклеточного домена IL2Ra представлены под следующими SEQ ID NO: SEQ ID NO:13 - SEQ ID NO:70 и SEQ ID NO:202 - SEQ ID NO:204.

[00278] Термин «секреторная сигнальная последовательность» обозначает полинуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид («секреторный пептид»), который, в качестве компонента более крупного полипептида, направляет более крупный полипептид по секреторному пути клетки, в которой он синтезируется. Более крупный полипептид обычно подвергают расщеплению с удалением секреторного пептида во время прохождения по секреторному пути. В контексте настоящего документа «зрелая» форма слитого белка или полипептида включает процессированную форму полипептида, из которой был удален секреторный пептид. В контексте настоящего документа «непроцессированная» форма слитого белка сохраняет последовательность секреторного пептида.

[00279] Также представлены биологически активные фрагменты и варианты зрелой и непроцессированной формы слитого белка IL2/EC-домена IL-Ra и полинуклеотид, который ее кодирует. Такой функциональный полипептидный фрагмент может содержать по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или более последовательных аминокислот любой последовательности под следующими SEQ ID NO: SEQ ID NO:13 - SEQ ID NO:70 и SEQ ID NO:202 - SEQ ID NO:204. Альтернативно, функциональный полипептидный вариант может иметь по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью, изложенной под следующими SEQ ID NO: SEQ ID NO:13 - SEQ ID NO:70 и SEQ ID NO:202 - SEQ ID NO:204.

[00280] Дополнительно представлены активные варианты и фрагменты полинуклеотидов, кодирующих слитые белки IL2/внеклеточного домена IL-Ra. Такой

полинуклеотид может содержать по меньшей мере 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1100, 1200, 1300, 1500, 1800, 2000 последовательных нуклеотидов, кодирующих полипептиды, представленные под следующими SEQ ID NO: SEQ ID NO:13 - SEQ ID NO:70 и SEQ ID NO:202 - SEQ ID NO:204, и продолжать кодировать функциональный слитый белок IL2/внеклеточного домена IL-Ra.

[00281] Кроме того, понятно, что компоненты слитого белка IL2/IL2R α могут быть в любом порядке. В соответствии с одним вариантом осуществления, полипептид IL2 находится на N-конце, а внеклеточный домен IL2R α находится на C-конце слитого белка.

[00282] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок образует димер. В соответствии с другими вариантами осуществления, слитый белок представляет собой мономер. При этом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, димер содержит два мономера, а мономеры связаны друг с другом ковалентными связями. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, димер содержит два мономера, а мономеры связаны нековалентными связями.

[00283] В соответствии с некоторым вариантом осуществления по настоящему раскрытию, слитый белок является более стабильным, чем полипептид, состоящий из IL2 (SEQ ID NO:2) или последовательности под SEQ ID NO:204 (последовательности IL2-CD25 дикого типа с 12-мономерным линкером без укорочения). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок обладает одним или несколькими свойствами, выбранными из группы, состоящей из (i) повышенной термодинамической стабильности по сравнению с эталонным белком; (ii) повышенной ТМ по сравнению с эталонным белком; (iii) повышенной устойчивости к разрушению по сравнению с эталонным белком; (iv) повышенной устойчивости к модификациям по сравнению с эталонным белком; (v) повышенной стабильности *in vivo* по сравнению с эталонным белком; и (vi) любой их комбинации, причем эталонный белок содержит (i) первый полипептид, содержащий полипептид интерлейкина-2 (IL2); и (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен из полипептида альфа-рецептора интерлейкина-2 (IL2R α); и имеет по меньшей мере на один сайт гликозилирования больше по сравнению с слитым белком.

[00284] Любой из сайтов гликозилирования раскрываемых в настоящем документе слитых белков может быть удален с помощью других механизмов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок дегликозилирован ферментативным или химическим путем. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый

белок дегидролизирован с помощью щелочи, гидразинолиза, пептид-N-гликозидазы F (ПНГазы F), эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазы H (эндо-H), O-гликозидазы или любой их комбинации.

[00285] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования слитого белка осуществляют путем обработки слитого белка щелочью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гликаны удаляют из гликозилированных полипептидов путем обработки боргидридом щелочного металла. В соответствии с другими вариантами осуществления, сайты гликозилирования раскрываемых в настоящем документе слитых белков могут быть удалены с помощью карбонатов щелочных металлов, таких как карбонат натрия и карбонат калия. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, щелочь применяют для обработки с целью β -отщепления.

[00286] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования слитого белка осуществляют химической обработкой слитого белка посредством гидразинолиза. В соответствии с одним вариантом осуществления, сайты гликозилирования дегликозилируют у раскрываемого в настоящем документе слитого белка путем проведения с слитым белком гидразинолиза, а высвобожденную сахарную цепь подвергают флуоресцентному мечению 2-аминопиридином. См. публикацию Hase *et al. J. Biochem.*, 95, 197 (1984). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гидразинолиз проводят с помощью прибора, поставляемого Oxford GlycoSystems (GlycoPrep 1000).

[00287] В соответствии с другим вариантом осуществления, удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования из слитого белка осуществляют путем воздействия на слитый белок трифторметансульфоновой кислотой (TFMS).

[00288] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования из слитого белка осуществляют путем обработки слитого белка ферментом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ферментом является гликозидаза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования из слитого белка осуществляют с помощью пептид-N-гликозидазы F (ПНГазы F). Концентрация ПНГазы F может варьировать и подлежит определению эмпирическим путем. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гликозидаза представляет собой ПНГазу F. ПНГазу F

представляет собой коммерчески доступный фермент (например, New England Biolabs, Ипсуич, Массачусетс, кат. № P0704 или № P0710). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ПНГаза F представляет собой слитый белок. Например, ПНГаза F может представлять собой ПНГазу F, меченную хитинсвязывающим доменом (CBD), или слитый белок ПНГазы F и SNAP. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гликозидаза является лиофилизированной. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гликозидаза представляет собой лиофилизированную ПНГазу F. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гликозидаза практически не содержит реагентов животного происхождения.

[00289] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования из слитого белка осуществляют путем обработки слитого белка эндо- β -N- ацетилглюкозаминидазой Н (эндо-Н). Эндо-Н представляет собой гликогидролазу, которая секретируется клетками *Streptomyces plicatus* и некоторыми другими видами *Streptomyces* species (Tarentino *et al.*, 1976). Она расщепляет β -1,4-гликозидную связь в N-ацетилглюкозаминовой центральной части олигосахаридов и оставляет одну N-ацетилхитобиозу, присоединенную к аспарагиновому остатку гликопротеина (Trimble *et al.*, 1978; Muramatsu 1971). Ген эндо-Н из *S. plicatus* составляет в длину 939 п. о. (регистрационный номер GenBank AAA26738.1) и кодирует белок массой 28,9 кДа. Эндо-Н из *S. plicatus* недавно была экспрессирована в *Pichia pastoris*, а дегликозилированная активность эндо-Н, продуцируемой *P. pastoris*, была продемонстрирована *in vitro* как при коферментационной, так и при постферментационной обработке (Wang *et al.*, 2015).

[00290] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования слитого белка осуществляют путем обработки слитого белка О-гликозидазой (New England Biolabs, Ипсуич, Массачусетс). О-гликозидаза, также называемая эндо-альфа-N-ацетилгалактозаминидазой, катализирует удаление О-сцепленных дисахаридов Core 1 и Core 3 из гликопротеинов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, она высвобождает незамещенные Ser- и Thr-связанные гликопротеины.

[00291] Удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования из слитого белка можно осуществить после того, как слитый белок IL2/IL2Ra был продуцирован в культуре клеток (например, в биореакторе), пока слитый белок IL2/IL2Ra продуцируется в культуре клеток, после того, как слитый белок был собран, и/или в процессе очистки слитого

белка. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования можно осуществить путем добавления одного или нескольких средств для удаления во время культивирования клеток в ходе экспрессии слитого белка. В соответствии с другими вариантами осуществления, удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования можно осуществить путем отбора конкретного типа клеток в качестве клетки-хозяина, которая не осуществляет гликозилирование или характеризуется пониженным гликозилированием (например, *E. coli* или *Streptomyces species*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, удаление одного или нескольких сайтов гликозилирования осуществляют путем совместной экспрессии гена, кодирующего слитый белок, с геном, кодирующим фермент, который удаляет один или несколько сайтов гликозилирования.

[00292] В представленной ниже таблице 4 перечислены различные аминокислотные последовательности IL-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемые в настоящем документе слитые белки содержат любую из последовательностей под SEQ ID NO:101 - SEQ ID NO:115, которые указаны в таблице 4.

Таблица 4.

SEQ ID NO:	Конструкция	Последовательность
101	IL2(21-153)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQ SIISTLT
102	IL2(21-153)(C145S)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT
103	IL2(21-153)(C145A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQ SIISTLT

104	IL2(21-153)(C145V)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFVQ SIISTLT
105	IL2(21-153)(T23A)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT
106	IL2(21-153)(T23A+C145S)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT
107	IL2(21-153)(T23A+C145A)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQ SIISTLT
108	NativeSigPep-IL2(1-153)	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELK PLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
109	M-IL2(C145S)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIISTLT
110	M-IL2(C145A)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA QSIISTLT
111	Del-A21-IL2	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLT

112	Del-A21-IL2(C145S)	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQS IISTLT
113	Del-A21-IL2(C145A)	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQS IISTLT
114	IL2(V111K)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQ SIISTLT
115	IL2(D40T)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLTQMI LNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQ SIISTLT

[00293] В представленной ниже таблице 5 перечислены различные аминокислотные последовательности линкера. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок включает несколько последовательно соединенных последовательностей, выбранных из любой последовательности под SEQ ID NO:116 - SEQ ID NO:127, которые указаны в таблице 5.

Таблица 5.

SEQ ID NO:	Конструкция	Последовательность
116	L1-(G3S)3	GGGSGGGSGGGS
117	L2-G2S2	GGSSGGAGGGGS
118	L3-(G3S)5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
119	L4-(G2S)3	GGSGGSGGS
120	L5-(G2S)5	GGSGGSGGSGGSGGS
121	L6-GGEEE	GGEEEGGEEEGS

122	L7- 12mer_Stiff	ESPEPETPEDES
123	L8- 22mer_Helix	GRGGEEKKKKEKEKEEQEERETK
124	L9-G	G
125	L10-GG	GG
126	L11-S	S
127	L12-GS	GS

[00294] В представленной ниже таблице 6 перечислены различные аминокислотные последовательности CD25. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемые в настоящем документе слитые белки содержат любую из последовательностей под SEQ ID NO:128 - SEQ ID NO:169, которые указаны в таблице 6.

Таблица 6.

SEQ ID NO:	Конструкция	Последовательность
128	CD25(22-240)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQS PMQPV DQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGE EKPQA SPEGRPESET SCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
129	CD25(22-212)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQS PMQPV DQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGE EKPQA SPEGRPESET S
130	CD25(22-187)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQP EEQKERKTTEMQS PMQPV DQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE

131	CD25(22-240)(C213S)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPQA SPEGRPESETSSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
132	CD25(22-192)-GGC	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQGGC
133	CD25(22-213)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPQA SPEGRPESETSC
134	CD25(22-187)(N70C)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGCSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE
135	CD25(22-187)(N89C)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRCTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE
136	CD25(22-187)-C	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEC
137	CD25(22-187)-G	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEG
138	CD25(22-212)-PP	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQS

		PMQPVDDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQA SPEGRPESETSP
139	CD25(22-212)(T106A)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKATEMQS PMQPVDDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQA SPEGRPESETS
140	CD25(22-212)(T95A)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVAPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQA SPEGRPESETS
141	CD25(22-212)(T95A+T106A)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVAPQPEEQKERKATEMQS PMQPVDDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQA SPEGRPESETS
142	CD25(22-212)-PG	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQA SPEGRPESETSPG
143	CD25(22-187)(N70Q+N89Q)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGQSSHSSWDNQCQCTSSATRQTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE
144	CD25(22-187)(N89Q)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRQTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE

145	CD25(22-187)(N70Q)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGQSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGE
146	CD25(22-211)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQA SPEGRPESET
147	CD25(22-210)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQA SPEGRPESE
148	CD25(22-209)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQA SPEGRPES
149	CD25(22-208)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQA SPEGRPE
150	CD25(22-207)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQA SPEGRP
151	CD25(22-206)	ELCDDDPPEI PHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLP GHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY

		RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQA SPEGR
152	CD25(22-205)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPREEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQA SPEG
153	CD25(22-204)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPREEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQA SPE
154	CD25(22-203)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPREEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQA SP
155	CD25(22-202)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPREEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQA S
156	CD25(22-201)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPREEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQA
157	CD25(22-200)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPREEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQ
158	CD25(22-199)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPREEQKERKTTEMQS

		PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKP
159	CD25(22-198)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEK
160	CD25(22-197)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEE
161	CD25(22-196)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGE
162	CD25(22-195)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPG
163	CD25(22-194)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFP
164	CD25(22-193)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQF
165	CD25(22-192)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQ
166	CD25(22-191)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQS

		PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETS
167	CD25(22-190)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMET
168	CD25(22-189)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEME
169	CD25(22-188)	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNLNCECKRGFRRIKSGSLYML CTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQS PMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEM

[00295] В представленной ниже таблице 7 перечислены различные аминокислотные последовательности линкера. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемые в настоящем документе слитые белки содержат любую из последовательностей под SEQ ID NO:170 - SEQ ID NO:186, которые указаны в таблице 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, линкерные последовательности отсутствуют (т. е. «TL0», как указано в таблице 7).

Таблица 7.

SEQ ID NO:	Конструкция	Последовательность
	TL0	-
170	TL1	G
171	TL2	GG
172	TL3	GS
173	TL4	GGG
174	TL5	GGGS
175	TL6	GGSGG
176	TL7	GGGSGG

177	TL8	GGSGGSG
178	TL9	GGSGGGSG
179	TL10	GGSGGGGSG
180	TL11	GGGGSGGGGS
181	TL12	GGGGSGGGGSG
182	TL13	EPKSS
183	TL14	PKSS
184	TL15	KSS
185	TL16	SS
186	TL17	S

[00296] В представленной ниже таблице 8 перечислены различные усиливающие аминокислотные последовательности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемые в настоящем документе слитые белки содержат любую из последовательностей под SEQ ID NO:187 - SEQ ID NO:201, которые указаны в таблице 8.

Таблица 8.

SEQ ID NO:	Конструкция	Последовательность
187	IgG1-Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG
188	IgG1. 1-Fc	DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG

189	IgG1. 3-Fc	DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
190	IgG1- Fc(P238K)	DKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
191	IgG4-Fc	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGK
192	IgG4. 1-F c	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGK
193	IgG1. 3-Fc- knob	DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
194	IgG1. 3-Fc-hole	DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

195	IgG1- Fc(P238K)- knob	DKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
196	IgG1- Fc(P238K)-hole	DKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
197	IgG1. 1- Fc(AZ1)	DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYVPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
198	IgG1. 1- Fc(AZ2)	DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPSREEMTKN QVSLLCVLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
199	HSA	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCFEDHVKLVNEVT EFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ EPERNECF LQHKDDNP NL PRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDE GKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV TDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKP LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDE FKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTL VEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS

		EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDK ETCFAEEGKKLVAASQAALGL
200	HSA(C34S)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVT EFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ EPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDE GKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV TDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKP LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDE FKPLVEEPQNLIKQNC ELFQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTL VEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDK ETCFAEEGKKLVAASQAALGL
201	HSA(C35A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVT EFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ EPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDE GKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV TDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKP LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM FLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDE FKPLVEEPQNLIKQNC ELFQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTL VEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDK ETCFAEEGKKLVAASQAALGL

[00297] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок содержит последовательность IL-2, выбранную из таблицы 4 (т. е. одну из последовательностей под SEQ ID NO:101 - SEQ ID NO:115) и последовательность CD25 из таблицы 6 (т. е. одну из последовательностей под SEQ ID NO:128

- SEQ ID NO:169). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок также содержит последовательность или несколько последовательно соединенных последовательностей, выбранных из таблицы 5 (т. е. одну или несколько из последовательностей под SEQ ID NO:116 - SEQ ID NO:127).

[00298] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок содержит последовательность IL-2, выбранную из представленной выше таблицы 4 (т. е. одну из последовательностей под SEQ ID NO:101 - SEQ ID NO:115) и последовательность CD25 из таблицы 6 (т. е. одну из последовательностей под SEQ ID NO:128 - SEQ ID NO:169), последовательность или несколько последовательно соединенных последовательностей, выбранных из таблицы 5 (т. е. одну или несколько из последовательностей под SEQ ID NO:116 - SEQ ID NO:127) и необязательный линкер, содержащий последовательность или несколько последовательно соединенных последовательностей из таблицы 7 (т. е. одну или несколько из последовательностей под SEQ ID NO:170 - SEQ ID NO:186).

[00299] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок содержит последовательность IL-2, выбранную из представленной выше таблицы 4 (т. е. одну из последовательностей под SEQ ID NO:101 - SEQ ID NO:115) и последовательность CD25 из таблицы 6 (т. е. одну из последовательностей под SEQ ID NO:128 - SEQ ID NO:169), последовательность или несколько последовательно соединенных последовательностей, выбранных из таблицы 5, и необязательный линкер, содержащий последовательность или несколько последовательно соединенных последовательностей из таблицы 8 (т. е. одну из последовательностей под SEQ ID NO:187 - SEQ ID NO:201).

[00300] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок содержит в следующем порядке: усиливающую последовательность из таблицы 8 (т. е. одну из последовательностей под SEQ ID NO:187 - SEQ ID NO:201), последовательность или несколько последовательно соединенных последовательностей, выбранных из таблицы 7 (т. е. одну или несколько из последовательностей под SEQ ID NO:170 - SEQ ID NO:186), последовательность IL-2, выбранную из таблицы 4 (т. е. одну из последовательностей под SEQ ID NO:101 - SEQ ID NO:115), и последовательность CD25 из таблицы 6 (т. е. одну из последовательностей под SEQ ID NO:128 - SEQ ID NO:169). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления,

слитый белок содержит последовательность или несколько последовательно соединенных последовательностей, выбранных из таблицы 7 (т. е. одну или несколько из последовательностей под SEQ ID NO:170 - SEQ ID NO:186). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок содержит последовательность или несколько последовательно соединенных последовательностей, выбранных из таблицы 5 (т. е. одну или несколько из последовательностей под SEQ ID NO:116 - SEQ ID NO:127).

7.4 Полинуклеотиды

[00301] Согласно определенным аспектам, в настоящем документе представлены полинуклеотиды, например, ДНК или РНК, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую описываемый в настоящем документе слитый белок, обладающий активностью IL2, а также векторы, содержащие такие полинуклеотидные последовательности, например, векторы экспрессии для эффективной их экспрессии в клетка-хозяевах, например, клетках млекопитающих. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе представлены полинуклеотидные последовательности, которые кодируют полипептидные последовательности под SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:70 и под SEQ ID NO:202 - SEQ ID NO:204.

[00302] В контексте настоящего документа «выделенный» полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты является молекулой, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике (например, у мыши или человека) молекулы нуклеиновой кислоты. Более того, «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может практически не содержать другого клеточного материала или культуральной среды при получении рекомбинантными методиками или практически не содержать химических предшественников или других химикатов при химическом синтезе. Например, выражение «практически без» включает препараты полинуклеотида или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие менее приблизительно 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (в частности, менее приблизительно 10%) другого материала, например, клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновых кислот, химических предшественников и/или других химикатов. В соответствии с конкретным вариантом осуществления, одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих описываемый в настоящем документе слитый белок, являются выделенными или очищенными.

[00303] Полинуклеотиды можно получить, а нуклеотидную последовательность полинуклеотидов можно определить любым способом, известным в настоящей области техники. Нуклеотидные последовательности, кодирующие описываемые в настоящем документе слитые белки, например, слитые белки, описываемые в таблице 3, и модифицированные версии этих слитых белков можно определить с помощью способов, хорошо известных в настоящей области техники, т. е. нуклеотидные кодоны, о которых известно, что они кодируют определенные аминокислоты, собирают таким образом, чтобы получить нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок. Такой полинуклеотид, кодирующий слитый белок, можно собрать из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, которые описаны в публикации Kutmeier G *et al.*, (1994), *BioTechniques* 17: 242-6), что, если вкратце, предусматривает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей слитый белок, гибридизацию и лигирование этих олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

[00304] Альтернативно, полинуклеотид, кодирующий описываемый в настоящем документе слитый белок можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с помощью способов, хорошо известных в настоящей области техники (например, ПЦР и других способов молекулярного клонирования). Например, ПЦР-амплификацию с применением синтетических праймеров, гибридизируемых с 3'- и 5'-концами известной последовательности, можно выполнить с использованием геномной ДНК, полученной из гибридомных клеток, продуцирующих представляющий интерес слитый белок. Такие способы ПЦР-амплификации можно применять для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую, например, IL2, линкерную последовательность или IL2-R α . Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для получения слитых белков.

[00305] Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретный слитый белок, недоступен, но последовательность молекулы слитого белка известна, нуклеиновую кислоту, кодирующую такой слитый белок, можно синтезировать химическими методами или получить из подходящего источника (например, библиотеки кДНК или библиотеки кДНК, полученной из нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли A+ РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих представляющие интерес белки, таких как клетки гибридомы, отобранные для экспрессии описываемого в настоящем

документе слитого белка) путем ПЦР-амплификации с применением синтетических праймеров, гибридизируемых с 3'- и 5'-концами последовательности, или путем клонирования с применением олигонуклеотидного зонда, специфичного для конкретной генной последовательности, для выявления, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, которая кодирует слитые белки. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные с помощью ПЦР, затем можно клонировать в реплицируемые векторы для клонирования с помощью любого способа, хорошо известного в настоящей области техники.

[00306] ДНК, кодирующую описываемые в настоящем документе слитые белки, можно легко выделить и секвенировать с помощью традиционных процедур (например, с применением олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими описываемые в настоящем документе слитые белки). Источником такой ДНК могут служить гибридомные клетки. После выделения ДНК можно поместить в векторы экспрессии, которые затем переносят путем трансфекции в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьян, клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza)) или миеломные клетки, которые в ином случае не продуцируют иммуноглобулиновый белок, с получением синтеза слитых белков в рекомбинантных клетках-хозяевах.

[00307] Кроме того, известно, что полинуклеотид, кодирующий слитый белок IL2/IL2R α , может содержать дополнительные элементы, которые способствуют трансляции слитого белка. К таким последовательностям относятся, например, последовательности Козака, присоединенные к 5'-концу полинуклеотида, кодирующего слитый белок. Консенсусная последовательность Козака представляет собой последовательность, которая встречается на эукариотической мРНК и играет роль в инициации процесса трансляции, а также имеет консенсусную последовательность (gee)gccRccAUGG (SEQ ID NO:92); где (1) строчная буква обозначает наиболее распространенное основание в положении, в котором основание, тем не менее, может изменяться; (2) заглавными буквами указаны высококонсервативные основания, т. е. последовательность «AUGG» является неизменной или изменяется редко, если вообще, за исключением кода неоднозначности «R» по системе IUPAC, которым указано, что в этом положении обычно наблюдается пурин (аденин или гуанин); и (3) последовательность в скобках ((gee)) имеет неопределенное значение.

[00308] В одном неограничивающем варианте осуществления слитый белок IL2/IL2R α содержит последовательность Козака, оптимизированную под лидерную

последовательность IL2, как указано под SEQ ID NO:92 (gccaccATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACCTTGTCAACAACAGT), или ее функциональный вариант или фрагмент. Функциональный вариант или фрагмент последовательности Козака будет сохранять способность увеличивать трансляцию белка по сравнению с уровнем трансляции с последовательности без лидерной последовательности. Такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 последовательных нуклеотидов последовательности Козака или последовательности, представленной под SEQ ID NO:92 или под SEQ ID NO:99 (gccaccATGG). Альтернативно, функциональный вариант может иметь по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью Козака или последовательностью, представленной под SEQ ID NO:92 или SEQ ID NO:99.

7.5 Клетки и векторы

[00309] Согласно определенным аспектам, в настоящем документе представлены клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантно) описываемые в настоящем документе слитые белки, и векторы экспрессии, содержащие нуклеотиды, которые кодируют описываемые в настоящем документе слитые белки. В настоящем документе представлены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие слитый белок для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах.

[00310] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин содержит описываемые в настоящем документе нуклеиновые кислоты.

[00311] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки насекомого, дрожжевой клетки, трансгенной клетки млекопитающего и клетки растения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, прокариотическая клетка представляет собой бактериальную клетку.

[00312] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. К таким клеткам-хозяевам млекопитающих

относятся без ограничения клетки CHO, VERO, BHK, HeLa, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (линия мышинных миеломных клеток, которые эндогенно не продуцируют никаких иммуноглобулиновых цепей), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst.

[00313] В контексте настоящего документа вектор экспрессии относится к любой конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит элементы, необходимые для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности, или, в случае вирусного РНК-вектора, элементы, необходимые для репликации и трансляции, при введении в подходящую клетку-хозяина. К векторам экспрессии могут относиться плазмиды, фагмиды, вирусы и их производные.

[00314] Последовательность для контроля экспрессии гена в контексте настоящего документа представляет собой любую регуляторную нуклеотидную последовательность, такую как промоторная последовательность или комбинация промотор-энхансер, которая способствует эффективной транскрипции и трансляции кодирующей нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Последовательность для контроля экспрессии гена может, например, представлять собой промотор млекопитающего или вируса, такой как конститутивный или индуцируемый промотор. К конституционным промоторам млекопитающих относятся без ограничения промоторы для следующих генов: гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы, бета-актиновый промотор и другие конститутивные промоторы. К иллюстративным вирусным промоторам, которые конститутивно функционируют в эукариотических клетках, относятся, например, промоторы от цитомегаловируса (CMV), обезьяньего вируса (например, SV40), вируса папилломы, аденовируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса саркомы Рауса, цитомегаловируса, длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Молони и других ретровирусов, а также промотор гена тимидинкиназы вируса простого герпеса. Рядовым специалистам в настоящей области техники известны и другие конститутивные промоторы. К промоторам, пригодным в качестве последовательностей для экспрессии генов по настоящему раскрытию, также относятся индуцируемые промоторы. Индуцируемые промоторы экспрессируются в присутствии индуцирующего средства. Например, промотор гена металлотионеина индуцируется к стимуляции транскрипции и трансляции в присутствии

ионов определенных металлов. Рядовым специалистам в настоящей области техники известны и другие индуцируемые промоторы.

[00315] Для настоящего раскрытия можно использовать многочисленные системы векторов экспрессии. Такие векторы экспрессии обычно реплицируются в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Векторы экспрессии могут включать последовательности для контроля экспрессии, в том числе без ограничения промоторы (например, естественно связанные или гетерологичные промоторы), энхансеры, сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, энхансерные элементы и последовательности окончания транскрипции. Предпочтительно, последовательности для контроля экспрессии представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева. В векторах экспрессии также могут быть использованы ДНК-элементы, которые происходят из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус коревой оспы, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV), цитомегаловирус (CMV) или вирус SV40. В других могут быть использованы полицистронные системы с сайтами внутренней посадки рибосомы.

[00316] Обычно векторы экспрессии содержат маркеры селекции (например, устойчивости к ампициллину, устойчивости к гигромицину, устойчивости к тетрациклину или устойчивости к неомицину), позволяющие детектировать те клетки, которые трансформированы требуемыми последовательностями ДНК (см., например, Itakura *et al.*, патент США № 4704362). Клетки, которые интегрировали ДНК в свои хромосомы, можно отобрать путем введения одного или нескольких маркеров, которые позволяют отобрать трансфицированные клетки-хозяева. Маркер может обеспечивать прототрофию ауксотрофного хозяина, устойчивость к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Ген селектируемого маркера может быть либо непосредственно связан с подлежащими экспрессии последовательностями ДНК, либо введен в ту же клетку путем совместной трансформации.

[00317] Примером вектора, пригодного для оптимизированной экспрессии слитых белков, применяемых в способах по настоящему раскрытию, является NEOSPLA (патент США № 6159730). Этот вектор содержит промотор/энхансер цитомегаловируса, основной промотор бета-глобина мыши, точку начала репликации SV40, последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста, экзон 1 и экзон 2 гена

неомицинофосфотрансферазы, ген дигидрофолатредуктазы и лидерную последовательность. Векторные системы также описаны в патентах США №№ 5736137 и 5658570. Такая система обеспечивает высокие уровни экспрессии, например >30 пг/клетка/сутки. Другие иллюстративные векторные системы раскрыты, например, в патенте США № 6413777.

[00318] В соответствии с другими вариантами осуществления, полипептиды по настоящему раскрытию экспрессируют с помощью полицистронных конструкций. В этих системах экспрессии с одной полицистронной конструкции можно получить множество представляющих интерес генных продуктов, таких как множественные полипептиды мультимерного связывающего белка. В этих системах преимущественно используют сайт внутренней посадки рибосомы (IRES) для обеспечения относительно высоких уровней полипептидов в эукариотических клетках-хозяевах. Совместимые последовательности IRES раскрыты в патенте США № 6193980.

[00319] В более общем случае, после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующей полипептид, вектор экспрессии можно ввести в подходящую клетку-хозяина. То есть клетки-хозяева можно трансформировать. Введение плазмиды в клетку-хозяина можно осуществить различными методиками, хорошо известными специалистам в настоящей области техники, как рассмотрено выше. Трансформированные клетки выращивают в условиях, подходящих для продуцирования слитого белка, и анализируют в отношении синтеза слитого белка. К иллюстративным методикам для анализа относятся твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) или анализ путем флуоресцентной сортировки клеток (FACS), иммуногистохимия и др.

7.6 Фармацевтические композиции

[00320] Различные раскрываемые в настоящем документе слитые белки IL2/IL2R α (также называемые в настоящем документе «активными соединениями») можно включить в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции обычно содержат слитый белок и фармацевтически приемлемый носитель. Применяемая в контексте настоящего документа фраза «фармацевтически приемлемый носитель» предназначена для включения любых без исключения растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, придающих изотоничность средств и замедляющих всасывание средств и т. п., совместимых с фармацевтическим введением. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо

известно в настоящей области техники. В композициях предусматривается применение любой традиционной среды или средства, кроме тех случаев, когда они несовместимы с активным соединением. В композиции также можно включить дополнительные активные соединения.

[00321] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (а) описываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α и (b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[00322] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (а) композицию, содержащую описываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α и (b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[00323] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (а) описываемую в настоящем документе нуклеиновую кислоту и (b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[00324] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (а) описываемый в настоящем документе вектор и (b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[00325] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (а) описываемую в настоящем документе клетку-хозяина и (b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[00326] Фармацевтическая композиция по настоящему раскрытию составлена так, чтобы быть совместимой с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральный, например, внутривенный, внутрикожный, подкожный, пероральный (например, ингаляционный), трансдермальный (местный) и трансмукозальный. Кроме того, может быть необходимо введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции локально в область, нуждающуюся в лечении. Это можно осуществить, например, с помощью местной или регионарной инфузии или перфузии во время операции, местного применения, инъекции, катетера, суппозитория или имплантата (например, имплантатов, сформированных из пористых, непористых или гелеобразных материалов, в том числе мембран, таких как сialастовые мембраны или волокна) и тому

подобное. В соответствии с другим вариантом осуществления, терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции доставляют в везикуле, такой как липосомы (см., например, Langer, Science 249:1527-33, 1990 и Treat *et al.*, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez Berestein and Fidler (eds.), Liss, N. Y., pp. 353-65, 1989).

[00327] В соответствии с еще одним вариантом осуществления, терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В соответствии с одним примером, можно применять помпу (см., например, Langer, Science 249:1527-33, 1990; Sefton, Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-40, 1987; Buchwald *et al.*, Surgery 88:507-16, 1980; Saudek *et al.*, N Engl. J Med. 321:574-79, 1989). В соответствии с другим примером, можно применять полимерные материалы (см., например, Levy *et al.*, Science 228:190-92, 1985; During *et al.*, Ann. Neural. 25:351-56, 1989; Howard *et al.*, J Neurosurg. 71:105-12, 1989). Также можно применять другие системы с контролируемым высвобождением, такие как те, что рассмотрены в публикации Langer (Science 249:1527-33, 1990).

[00328] Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для принимающих их пациентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и с другими органическими кислотами; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метилпарабен или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (менее приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; разновидности сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[00329] Фармацевтически приемлемые носители, пригодные в парентеральных препаратах, включают водные среды, неводные среды, противомикробные средства,

придающие изотоничность средства, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие средства, эмульгирующие средства, комплексообразующие или хелатирующие средства и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных сред включают инъекцию хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера, изотонический инъекционный раствор декстрозы, стерильную воду для инъекций, инъекционный раствор декстрозы и инъекционный раствор Рингера с добавлением лактата. Неводные парентеральные среды включают жирные масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. К парентеральным препаратам, упакованным в многодозовые емкости, можно добавлять противомикробные средства в бактериостатических или фунгистатических концентрациях, к которым относятся фенолы или крезолы, ртуть, бензиловый спирт, хлорбутанол, сложные эфиры метил- и пропил-пара-гидроксibenзойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. К придающим изотоничность средствам относятся хлорид натрия и декстроза. К буферам относятся фосфатный и цитратный. К антиоксидантам относится бисульфат натрия. К местным анестетикам относится гидрохлорид прокаина. К суспендирующим и диспергирующим средствам относятся карбоксиметилцеллюлоза натрия, гидроксипропилметилцеллюлоза и поливинилпирролидон. К эмульгирующим средствам относится полисорбат 80 (TWEEN® 80). К комплексообразующим или хелатирующим средствам относится ЭДТА. К фармацевтическим носителям также относится этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой сред; и гидроксид натрия, соляная кислота, лимонная кислота или молочная кислота для регулирования pH.

[00330] Растворы или суспензии, применяемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Уровень pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат можно заключить в ампулы,

одноразовые шприцы или флаконы для многократных доз, изготовленные из стекла или пластика.

[00331] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. В случае внутривенного введения к подходящим носителям относятся физиологический раствор, бактериостатическая вода, Cremophor ELS (BASF; Парсиппини, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко набрать с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и подходящие их смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов можно достичь с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и др. Во многих случаях предпочтительно включение в композицию придающих изотоничность средств, например, сахаров, многоатомных спиртов, таких как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированную абсорбцию инъекционных композиций можно достичь путем включения в композицию средства, которое задерживает абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[00332] Стерильные инъекционные растворы можно получать посредством включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель при необходимости с одним или комбинацией перечисленных ранее ингредиентов, с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильную среду для лекарства, которая содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сушка с вымораживанием, с помощью которых на выходе получают порошок активного ингредиента

плюс любой дополнительный необходимый ингредиент из его подвергнутого ранее стерилизацией фильтрованием раствора.

[00333] В случае введения путем ингаляции соединения доставляют в форме аэрозольного спрея из находящейся под давлением емкости или дозатора, который содержит подходящий газ-вытеснитель, например такой газ, как диоксид углерода, или небулайзера. Системное введение также можно осуществлять трансмукозальным или трансдермальным путем.

[00334] В случае трансмукозального или трансдермального введения в составе применяют смачивающие вещества, подходящие для барьера, через который необходимо проникнуть. Такие смачивающие вещества обычно известны в настоящей области техники и включают, например, средства для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты. Трансмуккозальное введение можно осуществлять с помощью назальных спреев или суппозиторияев. В случае трансдермального введения активные соединения составляют в мази, бальзамы, гели или кремы, как это обычно известно из уровня техники. Соединения также можно приготовить в форме суппозиторияев (например, с обычными основами для суппозиторияев, такими как какао-масло и другие глицериды) или удерживающих клизм для ректальной доставки.

[00335] В соответствии с одним вариантом осуществления, активные соединения готовят с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, например, в виде состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления таких составов будут очевидны специалистам в настоящей области техники. Материалы также можно коммерчески приобрести у компаний Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. В качестве фармацевтически приемлемых носителей также можно применять липосомальные суспензии. Их можно приготовить согласно способам, известным специалистам в настоящей области техники, например, как описано в патенте США № 4522811.

[00336] Особенно предпочтительным является составление пероральных или парентеральных композиций в единичную дозированную форму для удобства введения и единообразия дозировки. В контексте настоящего документа единица дозирования обозначает физически дискретные единицы, подходящие в качестве однократных дозировок для

подлежащего лечению субъекта; при этом каждая единица содержит предопределенное количество активного соединения, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация единичных дозированных форм по настоящему раскрытию продиктована уникальными характеристиками активного соединения и конкретным терапевтическим эффектом, который необходимо достичь, а также ограничениями, присущими области техники получения смесей такого функционального соединения для лечения индивидуумов, и непосредственно зависит от них. Фармацевтические композиции можно заключить в емкость, упаковку или дозатор вместе с инструкциями по применению.

[00337] Эффективное количество слитого белка IL2/IL2R α , пригодного для модуляции таких функций, будет зависеть от подвергаемого лечению субъекта, тяжести болезни и способа введения слитого белка IL2/IL2R α . К иллюстративным дозам относятся от приблизительно 104 до приблизительно 107 МЕ активности IL2 на взрослого, от приблизительно 104 до 105 МЕ активности IL2 на взрослого, от приблизительно 105 до приблизительно 106 МЕ активности IL2 на взрослого, от приблизительно 106 до приблизительно 107 МЕ активности IL2 на взрослого. В других случаях терапевтически эффективная доза слитого белка IL2/IL2R α составляет приблизительно 105 МЕ активности IL2 $\pm$ 100-кратная, приблизительно 105 МЕ активности IL2 $\pm$ 10-кратная, приблизительно 105 МЕ активности IL2 $\pm$ 2-кратная, приблизительно 105 МЕ активности IL2 $\pm$ 20-кратная, приблизительно 105 МЕ активности IL2 $\pm$ 30-кратная, приблизительно 105 МЕ активности IL2 $\pm$ 40-кратная, приблизительно 105 МЕ активности IL2 $\pm$ 50-кратная, приблизительно 105 МЕ активности IL2 $\pm$ 60-кратная, приблизительно 105 МЕ активности IL2 $\pm$ 70-кратная, приблизительно 105 МЕ активности IL2 $\pm$ 80-кратная или приблизительно 105 МЕ активности IL2 $\pm$ 90-кратная. В соответствии с конкретным неограничивающим вариантом осуществления, слитый белок IL2 человека вводят в такой дозировке.

7.7 Применения и способы

7.7.1 Способы получения раскрываемых в настоящем документе композиций

[00338] Как рассмотрено выше, раскрываемые в настоящем документе слитые белки IL2/IL2R α можно применять для создания новых слитых белков IL2/IL2R α путем модификации IL2, IL2R α или любой описанной в настоящем документе последовательности гетерологичного фрагмента. Таким образом, согласно другому аспекту, описываемые в

настоящем документе структурные признаки описываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α применяют для создания структурно родственных слитых белков IL2/IL2R α , которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство описываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α , такое как связывание с IL2R α человека и IL2R α яванского макака. Например, одно или несколько из IL2, IL2R α или любой описываемой в настоящем документе последовательности гетерологичного фрагмента можно рекомбинантными методами объединить в комбинацию с известными каркасными участками и/или другими белками для создания дополнительного, сконструированного методами рекомбинантной инженерии, описываемого в настоящем документе слитого белка, как рассмотрено выше.

[00339] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе раскрыты способы получения слитого белка IL2/IL2R α , предусматривающие культивирование клетки-хозяина, содержащий слитый белок, в подходящих условиях и выделение слитого белка. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку или прокариотическую клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, клетку насекомого, грибную клетку, клетку растения, трансгенную клетку млекопитающего или бактериальную клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из клетки CHO, клетки HEK 293, клетки NS0, клетки Per C6, клетки BHK и клетки COS. В соответствии с одним вариантом осуществления, клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку. В соответствии с конкретным вариантом осуществления, бактериальная клетка представляет собой *Escherichia coli*.

[00340] Другие типы модификаций включают модификации, которые описаны в предыдущем разделе. Исходным материалом для способов конструирования является одна или несколько представленных в настоящем документе последовательностей IL2 или IL2R α . Для создания сконструированного слитого белка нет необходимости фактически получать (т. е. экспрессировать в виде белка) слитый белок, имеющий одну или несколько представленных в настоящем документе последовательностей IL2 или IL2R α . Вместо этого информацию, содержащуюся в последовательности(последовательностях), применяют в качестве исходного материала для создания последовательности(последовательностей) «второго поколения», производных от исходной последовательности(последовательностей), а затем

последовательность(последовательности) «второго поколения» получают и экспрессируют в виде белка.

[00341] Следовательно, настоящее изобретение относится к способам получения слитого белка, предусматривающим: (a) обеспечение наличия IL2 и IL2R α ; (b) изменение по меньшей мере одного аминокислотного остатка в IL2 и IL2R α с получением по меньшей мере одной измененной последовательности слитого белка и (c) экспрессию измененной последовательности слитого белка в виде белка.

[00342] Также настоящее изобретение относится к способам получения слитого белка, предусматривающим: (a) обеспечение наличия IL2 и IL2R α ; (b) изменение по меньшей мере одного сайта гликозилирования в IL2 и IL2R α с получением по меньшей мере одного измененного сайта гликозилирования; и (c) экспрессию измененной последовательности слитого белка в виде белка.

[00343] Измененное антитело может характеризоваться одним или несколькими, двумя или более, тремя или более, четырьмя или более, пятью или более, шестью или более, семью или более, восемью или более, девятью или более или всеми функциональными свойствами, изложенными выше под пунктами (1) - (10). Функциональные свойства измененных антител можно оценить с помощью стандартных анализов, доступных в настоящей области техники.

[00344] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способов конструирования описываемых в настоящем документе слитых белков IL2/IL2R α , мутации можно внести случайным образом или избирательно по всей или части последовательности, кодирующей слитых белков IL2/IL2R α , и полученные модифицированные слитые белки IL2/IL2R α можно подвергнуть скринингу в отношении активности связывания и/или в отношении других функциональных свойств, которые описаны в настоящем документе. Способы внесения мутаций были описаны в предшествующем уровне техники. Например, в РСТ-публикации WO 02/092780, за авторством Short, описаны способы создания и скрининга мутаций с помощью насыщающего мутагенеза, синтетической сборки путем лигирования или их комбинации. Альтернативно, в РСТ-публикации WO 03/074679, за авторством Lazar и соавт., описаны способы применения вычислительных способов скрининга для оптимизации физико-химических свойств белков.

[00345] Композиции дополнительно включают выделенные полинуклеотиды, которые кодируют различные описываемые выше в настоящем документе слитые белки и их

варианты и фрагменты. Дополнительно раскрыты векторы и кассеты экспрессии, содержащие описываемые в настоящем документе полинуклеотиды. Кассеты экспрессии обычно будут включать промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, и участок окончания транскрипции и трансляции.

[00346] Применение термина «полинуклеотид» не предназначено для ограничения настоящего раскрытия до полинуклеотидов, содержащих ДНК. Специалисты в настоящей области техники поймут, что полинуклеотиды могут содержать рибонуклеотиды и комбинации рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов. Такие дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды включают как встречающиеся в природе молекулы, так и синтетические аналоги.

[00347] Будет понятно, что в конструкциях, которые включают более одного сайта процессинга или расщепления, такие сайты могут быть одинаковыми или различаться.

[00348] «Выделенный» или «очищенный» полинуклеотид или белок либо его биологически активная часть практически или фактически не содержит компонентов, обычно сопровождающих или взаимодействующих с полинуклеотидом или белком и которые встречаются в его естественной среде. Таким образом, выделенный или очищенный полинуклеотид или белок практически не содержит другого клеточного материала или культуральной среды при получении рекомбинантными методиками или практически не содержит химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. В оптимальном варианте, «выделенный» полинуклеотид не содержит последовательностей (в оптимальном варианте, кодирующих белки последовательностей), которые в норме фланкируют полинуклеотид (т. е. последовательностей, расположенных на 5'- и 3'-концах полинуклеотида) в геномной ДНК организма, из которого такой полинуклеотид получен. Например, в соответствии с различными вариантами осуществления, выделенный полинуклеотид может содержать менее приблизительно 5 т. о., 4 т. о., 3 т. о., 2 т. о., 1 т. о., 0,5 т. о. или 0,1 т. о. нуклеотидной последовательности, которая в норме фланкирует полинуклеотид в геномной ДНК клетки, из которой такой полинуклеотид получен.

[00349] Белок, который практически не содержит клеточного материала, включает препараты белка, содержащие менее приблизительно 30%, 20%, 10%, 5% или 1% (по сухой массе) загрязняющего белка. Если белок по настоящему раскрытию или его биологически активную часть получают рекомбинантно, в оптимальном варианте культуральная среда представляет собой менее приблизительно 30%, 20%, 10%, 5% или 1% (по

сухой массе) химических предшественников или не относящихся к представляющему интерес белку химических веществ.

[00350] В данном случае можно использовать общепринятые методики молекулярной биологии, микробиологии и рекомбинантной ДНК, известные специалисту в настоящей области техники. Такие методики полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gaited. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R. I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

[00351] Настоящее изобретение также относится к вектору, который содержит описанные выше полинуклеотиды, функционально связанные с промотором. Нуклеотидная последовательность является «функционально связанной» с последовательностью для контроля экспрессии (например, промотором), если последовательность для контроля экспрессии контролирует и регулирует транскрипцию и трансляцию этой последовательности. Термин «функционально связанный» применительно к нуклеотидной последовательности включает наличие соответствующего стартового сигнала (например, ATG) перед подлежащей экспрессии нуклеотидной последовательностью, и поддержание правильной рамки считывания для обеспечения экспрессии последовательности под контролем последовательности для контроля экспрессии, и продуцирование требуемого продукта, кодируемого такой последовательностью. Если ген, который необходимо вставить в рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, не содержит соответствующего стартового сигнала, такой стартовый сигнал можно вставить перед геном. «Вектор» представляет собой репликон, такой как плазида, фаг или космида, к которому может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты с тем, чтобы вызвать репликацию присоединенного сегмента. Промотор может быть или является идентичным промотору от бактерий, дрожжей, насекомых или млекопитающих. Кроме того, вектор может представлять собой плазмиду, космиду, искусственную хромосому дрожжей (YAC), бактериофаг или вирусную ДНК эукариот. Можно применять и другие многочисленные остовы вектора, о которых в настоящей области техники

известно, что они пригодны для экспрессии белка. К таким векторам относятся без ограничения следующие: аденовирус, обезьяний вирус 40 (SV40), цитомегаловирус (CMV), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), вирус лейкоза Молони мышей, системы доставки ДНК, т. е. липосомы, и системы доставки экспрессионных плазмид. Кроме того, в одном классе векторов векторы содержат ДНК-элементы, полученные от вирусов, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, бакуловирус, ретровирусы или вирус леса Семлики. Такие векторы можно приобрести коммерчески или собрать из описанных последовательностей с помощью способов, хорошо известных из уровня техники.

[00352] В настоящем документе представлена векторная система хозяина для получения полипептида, которая включает вектор подходящей клетки-хозяина. К подходящим клеткам-хозяевам относятся без ограничения прокариотические или эукариотические клетки, например, бактериальные клетки (в том числе грамположительные клетки), дрожжевые клетки, грибковые клетки, клетки насекомых и клетки животных. В качестве хозяев можно применять многочисленные клетки млекопитающих, в том числе без ограничения мышиный фибробласт NIH 3T3, клетки CHO, клетки HeLa, клетки Ltk и т. д. Также можно применять и дополнительные клетки животных, такие как R1.1, клетки B-W и L-M, клетки почек африканской зеленой мартышки (например, COS1, COS7, BSC1, BSC40 и BMT10), клетки насекомых (например, Sf9), а также клетки человека и клетки растений в культуре ткани.

[00353] Для экспрессии представленных в настоящем документе полинуклеотидных последовательностей можно использовать широкий спектр комбинаций хозяин/вектор экспрессии. Например, подходящие векторы экспрессии могут состоять из сегментов хромосомных, нехромосомных и синтетических последовательностей ДНК. К подходящим векторам относятся производные SV40 и известные бактериальные плазмиды, например, плазмиды *E. coli* col E1, pCR1, pBR322, pMB9 и их производные, такие плазмиды, как RP4; фаговые ДНК, например, многочисленные производные фага λ , например, NM989, и другие фаговые ДНК, например, M13 и нитчатая одноцепочечная фаговая ДНК; дрожжевые плазмиды, такие как плазида 2 μ или ее производные; векторы, пригодные в эукариотических клетках, такие как векторы, пригодные в клетках насекомых или млекопитающих; векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговых ДНК, таких как плазмиды, которые были модифицированы для использования фаговой ДНК или других последовательностей для контроля экспрессию; и др.

[00354] Для экспрессии полинуклеотидных последовательностей, представленных в настоящем документе, в этих векторах можно использовать любую из широкого спектра последовательностей для контроля экспрессии (последовательностей, которые контролируют экспрессию функционально связанной с ней нуклеотидной последовательности). К таким пригодным последовательностям для контроля экспрессии относятся, например, ранние или поздние промоторы SV40, CMV, вируса коровьей оспы, полиомы или аденовируса, система lac, система trp, система TAC, система TRC, система LTR, главные операторные и промоторные участки фага λ , регуляторные участки гена белка оболочки fd, промотор гена 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы гена кислой фосфатазы (например, Pho5), промоторы гена дрожжевых факторов спаривания a и другие последовательности, которые известны для контроля экспрессии генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов, а также различные их комбинации.

[00355] Будет понятно, что не все векторы, последовательности для контроля экспрессии и хозяева будут одинаково хорошо функционировать для экспрессии представленных в настоящем документе полинуклеотидных последовательностей. Равно как и не все хозяева одинаково хорошо функционируют с одной и той же системой экспрессии. Тем не менее, специалист в настоящей области техники без постановки излишних экспериментов сможет подобрать подходящие векторы, последовательности для контроля экспрессии и хозяев для достижения требуемой экспрессии, не выходя за рамки объема настоящего раскрытия. Например, при выборе вектора необходимо учитывать хозяина, потому что вектор должен в нем функционировать. Также будут учитываться количество копий вектора, возможность контролировать такое количество копий и экспрессия любых других белков, кодируемых вектором, таких как антибиотические маркеры.

[00356] При выборе последовательности для контроля экспрессии обычно будут учитываться ряд факторов. К ним относятся, например, относительная сила системы, ее контролируемость и ее совместимость с конкретной нуклеотидной последовательностью или геном, которые подлежат экспрессии, особенно в отношении потенциальных вторичных структур. Подходящие одноклеточные хозяева будут подбираться с учетом, например, их совместимости с выбранным вектором, их характеристик секреции, их способности правильно сворачивать белки и их требований к ферментации, а также токсичности, оказываемой на

хозяина, от продукта, кодируемого подвергаемыми экспрессии нуклеотидными последовательностями, и простоты очистки продуктов экспрессии.

[00357] При получении кассеты экспрессии можно производить манипуляции с различными полинуклеотидами с тем, чтобы обеспечить правильную ориентацию полинуклеотидных последовательностей и, при необходимости, получить надлежащую рамку считывания. С этой целью для присоединения полинуклеотидов можно использовать адаптеры или линкеры или можно произвести другие манипуляции для получения удобных сайтов рестрикции, удаления лишней ДНК, удаления сайтов рестрикции и т. п. Например, между полипептидами можно добавить линкеры, такие как два глицина. Для инициации транскрипции гена можно добавить метиониновые остатки, кодируемые нуклеотидными последовательностями ATG. С этой целью можно задействовать мутагенез *in vitro*, праймерную репарацию, рестрикцию, гибридизацию, повторные замены, например, транзиции и трансверсии.

[00358] Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения полипептида, который предусматривает экспрессию полинуклеотида, кодирующего описываемый в настоящем документе слитый белок, в клетке-хозяине в подходящих условиях, позволяющих продуцировать полипептид, и выделение полученного таким образом полипептида.

7.7.2 Терапевтические применения и способы

[00359] Описываемые в настоящем документе слитые белки и способы имеют множество назначений *in vitro* и *in vivo*, в том числе, например, усиление иммунного ответа, например, путем ингибирования (или антагонизма) IL2R α (например, передачи его сигнала) или детектирования IL2. Например, описываемые в настоящем документе слитые белки IL2/IL2R α можно вводить клеткам в культуре, *in vitro* или *ex vivo* или субъектам-людям, например, *in vivo*, для усиления иммунитета при различных заболеваниях. Соответственно, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в том субъекта, предусматривающему введение субъекту описываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α так, чтобы у субъекта модифицировался иммунный ответ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ответ усиливается, стимулируется или подвергается положительной регуляции.

[00360] К субъектам, подходящим для настоящих способов, относятся пациенты-люди, для которых было бы желательно усиление иммунного ответа. Способы особенно подходят для лечения пациентов-людей, страдающих нарушением, которое можно лечить путем усиления иммунного ответа (например, Т-клеточного иммунного ответа, например, антигенспецифического Т-клеточного ответа). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы особенно подходят для лечения рака *in vivo*. Для достижения антигенспецифического усиления иммунитета описываемые в настоящем документе слитые белки IL2/IL2R α можно вводить вместе с представляющим интерес антигеном, или антиген может уже присутствовать у подлежащего лечению субъекта (например, у субъекта, являющегося носителем опухоли или вируса). Если описываемые в настоящем документе слитые белки IL2/IL2R α вводят совместно с другим средством, оба их можно вводить раздельно или одновременно.

[00361] Также настоящим изобретением охватываются способы детектирования наличия IL2 человека или IL2R α человека в образце или измерения количества антигена IL2 человека, предусматривающие приведение образца и контрольного образца в контакт с слитым белком или моноклональным антителом, например, моноклональным антителом человека или его антигенсвязывающей частью, которые специфически связываются с IL2 или IL2R α человека, в условиях, которые делают возможным образование комплекса между описываемыми в настоящем документе слитыми белками IL2/IL2R α и IL2R α человека. Затем детектируют образование комплекса, при этом различное образование комплекса между образцом относительно контрольного образца свидетельствует о наличии в образце антигена IL2 или IL2R α человека. Более того, описываемые в настоящем документе слитые белки IL2/IL2R α можно применять для очистки IL2 или IL2R α человека посредством иммуноаффинной очистки.

[00362] Учитывая способность описываемых в настоящем документе слитых белков IL2/IL2R α стимулировать или совместно стимулировать Т-клеточные ответы, например, антигенспецифические Т-клеточные ответы, так, например, путем ингибирования отрицательных эффектов IL2 или IL2R α , в настоящем документе представлены способы *in vitro* и *in vivo* применения описываемых в настоящем документе слитых белков IL2/IL2R α для стимуляции, усиления или повышения антигенспецифических Т-клеточных ответов, например, противоопухолевых Т-клеточных ответов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, также предложена стимуляция CD3 (например, путем совместной

инкубации с клеткой, экспрессирующей мембранный CD3), причем такую стимуляцию можно производить одновременно, до или после стимуляции описываемыми в настоящем документе слитыми белками IL2/IL2R α . Например, настоящее изобретение относится к способам стимуляции антигенспецифического Т-клеточного ответа, предусматривающим приведение указанной Т-клетки в контакт с описываемыми в настоящем документе слитыми белками IL2/IL2R α и, необязательно, с антителом к CD3 с тем, чтобы простимулировать антигенспецифический Т-клеточный ответ.

[00363] Для измерения антигенспецифического Т-клеточного ответа можно использовать любой подходящий индикатор антигенспецифического Т-клеточного ответа. Неограничивающие примеры таких подходящих индикаторов включают повышенную пролиферацию Т-клеток в присутствии антитела и/или увеличение продуцирования цитокинов в присутствии антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, стимулируется продуцирование интерлейкина 2 и/или интерферона- γ антигенспецифическими Т-клетками.

[00364] К Т-клеткам, которые можно увеличить в количестве или совместно стимулировать с помощью описываемых в настоящем документе слитых белков IL2/IL2R α , относятся CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки. Т-клетки могут быть Teff-клетками, например CD4⁺ Teff-клетками, CD8⁺ Teff-клетками, Т-хелперными (Th) клетками (например, Th1-клетками) или Т-цитотоксическими (Tc) клетками.

[00365] Дополнительно настоящее изобретение относится к способам стимуляции иммунного ответа (например, антигенспецифического Т-клеточного ответа) у субъекта, предусматривающим введение описываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α субъекту с тем, чтобы простимулировать иммунный ответ (например, антигенспецифический Т-клеточный ответ) у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, субъект является субъектом-носителем опухоли, и у него стимулируется иммунный ответ к опухоли. Опухоль может представлять собой солидную опухоль или жидкую опухоль, например, гематологическое злокачественное новообразование. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, опухоль представляет собой иммуногенную опухоль. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, опухоль является неиммуногенной. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, опухоль является PD-L1 положительной. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления,

опухоль является PD-L1 отрицательной. Субъект также может быть носителем вируса, и у него стимулируется иммунный ответ против вируса.

[00366] Кроме того, настоящее изобретение относится к способам ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающим введение субъекту описываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α с тем, чтобы у субъекта ингибировать рост опухоли. Также настоящее изобретение относится к способам лечения вирусной инфекции у субъекта, предусматривающим введение субъекту описываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α с тем, чтобы подвергнуть лечению вирусную инфекцию у субъекта.

[00367] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят субъекту в качестве вспомогательной терапии. Лечение субъектов, имеющих рак, описываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α может привести к продлению срока дожития, например, к долгосрочному устойчивому ответу по сравнению с текущим стандартом лечения; к продлению дожития не менее чем на 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1, 2, 3, 4, 5, 10 или более лет или к периоду жизни без рецидивов не менее 3 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, 1, 2, 3, 4, 5 или 10 или более лет. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, лечение субъекта, имеющего рак, с помощью описываемых в настоящем документе слитых белков IL2/IL2R α предотвращает рецидив рака или задерживает рецидив рака, например, на 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1, 2, 3, 4, 5, или 10 и более лет. Лечение слитым белком IL2/IL2R α можно применять в качестве терапии первой, второй или третьей линии.

[00368] Лечение субъекта, имеющего рак, описываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α может приводить, например, к стабилизации заболевания, частичному ответу, увеличению общего периода дожития, увеличению периода жизни без заболевания или увеличению периода жизни без прогрессирования заболевания.

[00369] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α не обладает значительной токсичностью. Например, описываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α не обладает значительной токсичностью для органа человека, например, одного или нескольких из печени, почки, головного мозга, легких и сердца, что определено, например, в клинических испытаниях. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α не оказывает значительного влияния на

инициирование нежелательного иммунного ответа, например, аутоиммунитета или воспаления.

[00370] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, лечение субъекта описываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α не приводит к чрезмерной стимуляции иммунной системы до такой степени, чтобы иммунная система субъекта затем атаковала самого субъекта (например, к аутоиммунному ответу) или приводит, например, к анафилаксии. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемые в настоящем документе слитые белки IL2/IL2R α не вызывают анафилаксию.

[00371] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, лечение субъекта описываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α не вызывает значительных воспалительных реакций, например, иммуноопосредованного пневмонита, иммуноопосредованного колита, иммуноопосредованного гепатита, иммуноопосредованного нефрита или почечной дисфункции, иммуноопосредованного гипопфизита, иммуноопосредованного гипотиреоза и гипертиреоза или других иммуноопосредованных неблагоприятных реакций. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, лечение субъекта описываемыми в настоящем документе слитыми белками IL2/IL2R α не вызывает значительных сердечных нарушений, например, желудочковой аритмии; глазных нарушений, например, иридоциклита; инфузионных реакций; повышения уровня амилазы, повышения уровня липазы; нарушений нервной системы, например, головокружения, периферическую и сенсорную невропатию; нарушений кожи и подкожной ткани, например, сыпь, зуд, эксфолиативный дерматит, многоформную эритему, витилиго или псориаз; респираторные, торакальные и средостенные нарушения, например, кашель; усталость; тошноту; снижение аппетита; запор; артралгию; или диарею.

[00372] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемые в настоящем документе слитые белки IL2/IL2R α обеспечивают синергетические противоопухолевые эффекты в сочетании с другой противораковой терапией, такой как соединение, которое стимулирует иммунную систему (например, иммуноонкологическое средство), например, описываемое в настоящем документе соединение или соединение, модулирующее описываемую в настоящем документе мишень.

[00373] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемые в настоящем документе слитые белки IL2/IL2R α вводят местно, через слизистую эпидермиса,

интраназальным, пероральным, вагинальным, ректальным, подъязычным, местным, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным, внутриартериальным, внутриоболочечным, внутрилимфатическим, внутриочаговым, внутрикапсульным, внутриглазничным, внутрисердечным, внутридермальным, транстрахеальным, подкожным, внутрикожным, внутрисуставным, подкапсулярным, субарахноидальным, интраспинальным, эпидуральным или надчревным путем.

[00374] Предусмотрены различные способы повышения иммунного ответа у субъекта. Такие способы предусматривают введение субъекту, нуждающемуся в повышении иммунного ответа, терапевтически эффективного количества слитого белка IL2/IL2R α . Также, в соответствии с конкретными вариантами осуществления, для усиления ответов с участием иммунных эффекторных клеток и клеток памяти задействуют временное применение более высоких доз IL2.

[00375] Предусмотрены различные способы понижения иммунного ответа у субъекта. Такие способы предусматривают введение субъекту, нуждающемуся в понижении иммунного ответа, терапевтически эффективного количества слитого белка IL2/IL2R α . Особый интерес представляет использование подавляющей силы Treg для ингибирования нежелательных иммунных ответов. Из полученных на мышах и людях данных видно, что усиление передачи сигналов с участием IL2R в результате воздействия низкой дозой IL2 избирательно стимулирует Treg и усиливает иммунные толерогенные механизмы. Представленные в настоящем документе слитые белки IL2/IL2R α представляют собой новую и улучшенную форму IL2, которая потенциально усиливает клетки Treg. Так, слитые белки IL2/IL2R α можно вводить пациентам с аутоиммунными заболеваниями, хроническим заболеванием «трансплантат против хозяина», реакциями отторжения трансплантата и другими патологическими состояниями, при которых целью является подавление самореактивности.

[00376] Ниже более подробно рассмотрены эти и другие описываемые в настоящем документе способы.

7.7.2.1 Рак

[00377] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения рака. Ингибирование IL2R α слитым белком IL2/IL2R α может усиливать иммунный ответ на раковые клетки у пациента, имеющего рак.

Настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, имеющего рак, предусматривающим введение субъекту описываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α таким образом, чтобы производить лечение субъекта, например, таким образом, чтобы ингибировать или уменьшить рост раковых опухолей и/или чтобы достичь регрессии опухоли и/или продлить период дожития. Слитый белок IL2/IL2R α можно применять отдельно для ингибирования роста раковых опухолей. Альтернативно, слитый белок IL2/IL2R α можно применять в сочетании с другим средством, например, другим иммуногенным средством, стандартным противораковым средством или другим антителом, как описано далее.

[00378] Соответственно, настоящее изобретение относится к способам лечения рака, например, путем ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающим введение субъекту терапевтически эффективного количества описываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α . Формы рака, рост которых можно ингибировать с помощью антител по настоящему раскрытию, включают формы рака, обычно поддающиеся иммунотерапии, и такие формы, которые обычно не поддаются иммунотерапии. Формами рака могут быть формы рака с солидными опухолями или со злокачественными новообразованиями крови (гемобластоз). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки, карциному эндометрия, рак яичников, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак головы и шеи, рак легких, рак желудка, герминогенный рак, рак костей, плоскоклеточный рак, рак кожи, новообразование центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, саркому, рак вирусного происхождения, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, ходжкинскую или неходжкинскую лимфому, рак поджелудочной железы, глиобластому, глиому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, миелому, карциному слюнной железы, рак почек, базальноклеточную карциному, меланому, рак предстательной железы, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, рак яичка, рак пищевода или рак головы или шеи и любые их комбинации.

[00379] Другие неограничивающие примеры форм рака для лечения включают плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный плоскоклеточный рак легкого (NSCLC), неплюскоклеточный NSCLC, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, почечный рак (например, светлоклеточную карциному), рак яичников, рак печени, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак почки

(например, почечноклеточную карциному (RCC)), рак предстательной железы (например, гормонорезистентную аденокарциному предстательной железы), рак щитовидной железы, нейробластому, рак поджелудочной железы, глиобластому (мультиформную глиобластому), рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, карциному толстой кишки и рак (или карциному) головы и шеи, рак желудка, герминому, детскую саркому, синоназальную опухоль натуральных киллеров, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как кожная или внутриглазная злокачественная меланома), рак кости, рак кожи, рак матки, рак анальной области, рак яичек, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак парашитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, солидные опухоли в детском возрасте, рак мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль спинного мозга, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, индуцированные внешними факторами формы рака, в том числе формы рака, индуцированные асбестом, связанные с вирусами формы рака или формы рака вирусного происхождения (например, от вируса папилломы человека (HPV-связанные опухоли или опухоли, вызванные HPV)) и гематологические злокачественные новообразования, происходящие от любой из двух веток развития гемоцитов, т. е. линии миелоидных клеток (которая производит гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или линии лимфоидных клеток (которая производит В-, Т-, NK-клетки и плазмциты), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, например, острая, хроническая, лимфоцитарная и/или миелогенная формы лейкоза, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелолейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелогенный лейкоз (CML), недифференцированный AML (M0), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2, с созревaniem клеток), промиелоцитарный лейкоз (M3 или вариант M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или вариант M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7), изолированная гранулоцитарная саркома и хлорома; лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточный гемобластоз, например, В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазмацитоидная лимфома, моноцитотидная В-

клеточная лимфома, лимфома лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), анапластическая (например, Ki 1+) крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослых, лимфома клеток мантийной зоны, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, Т-клеточная лимфома кишечника, первичная В-клеточная лимфома средостения, Т-лимфобластная лимфома клеток-предшественников, Т-лимфобластная лимфома; и лимфомы/лейкозы (T-Lbly/T-ALL), периферическая Т-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, истинная гистиоцитарная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная эффузионная лимфома, В-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома (LBL), гемопозитические опухоли лимфоидной ветки дифференцировки, острый лимфобластный лейкоз, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, лимфома Беркитта, фолликулярная лимфома, диффузная гистиоцитарная лимфома (DHL), иммунобластная крупноклеточная лимфома, В-лимфобластная лимфома клеток-предшественников, кожная Т-клеточная лимфома (CTLC) (также называемая фунгоидными микозами или синдромом Сезари) и лимфоплазмацитоидная лимфома (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как миелома IgG, миелома легкой цепи, несекреторная миелома, вялотекущая миелома (также называемая медленно развивающейся миеломой), одиночная плазмоцитома и множественные миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточная лимфома; гематопозитические опухоли миелоидной ветки дифференцировки, опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; сперматоцитому, тератокарциному, опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, сперматоцитому, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному, гемопозитические опухоли лимфоидной ветки дифференцировки, например, Т-клеточные и В-клеточные опухоли, включая без ограничения Т-клеточные расстройства, такие как Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), включая мелкоклеточный и медуллярный тип клеток; лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (LGL) Т-клеточного типа; a/d Т-клеточную неходжкинскую лимфому печени и селезенки; периферическую/посттимусную Т-клеточную лимфому (плеоморфного и иммунобластного подтипов); (назальную) Т-клеточную лимфангиому; рак головы или шеи, почечный рак, рак прямой кишки, рак щитовидной железы;

острую миелоидную лимфому, а также любые комбинации указанных форм рака. Описываемые в настоящем документе способы также можно применять для лечения метастатических форм рака, неоперабельных, резистентных форм рака (например, форм рака, устойчивых к предыдущей иммунотерапии, например, с помощью блокирующих антител к CTLA-4 или PD-1) и/или рецидивирующих форм рака.

[00380] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят пациентам, имеющим рак, который характеризовался неадекватным ответом или продолжал прогрессировать на этапе предшествующего лечения, например, предшествующего лечения иммуноонкологическим или иммунотерапевтическим лекарственным средством, или пациентам, имеющим рак, который является рефрактерным или резистентным, либо по своей природе рефрактерным, либо резистентным (например, рефрактерным к антагонисту пути PD-1), либо который приобретает резистентное или рефрактерное состояние. Например, субъектов, которые не отвечают или недостаточно отвечают на первую терапию или у которых наблюдается прогрессирование заболевания после лечения, например, лечения антителом к PD-1, можно лечить путем введения описываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α отдельно или в комбинации с другой терапией (например, с терапией антителом к PD-1).

[00381] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят пациентам, которые ранее не получали иммуноонкологическое средство (т. е. не проходили лечение с его помощью), например, антагонист пути PD-1.

[00382] Способ лечения субъекта, имеющего рак, с помощью описываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α может предусматривать введение субъекту, у которого есть раковые клетки, экспрессирующие IL2 или IL2R α , терапевтически эффективного количества раскрываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α . Настоящее изобретение также относится к способам прогнозирования того, будет ли субъект отвечать на лечение раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α , причем способы предусматривают определение уровня IL2 или IL2R α у пациента, и если субъект является положительным по IL2 или IL2R α , тогда субъект, вероятно, будет отвечать на лечение раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α .

[00383] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способ лечения рака у субъекта предусматривает сначала определение того, является ли субъект

положительным по PD-L1 или PD-1, например, имеет ли он опухолевые клетки или TIL, которые экспрессируют PD-L1 или PD-1, и если у субъекта есть положительные по PD-L1 или PD-1 раковые клетки или TIL-клетки, то введение субъекту раскрываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α (и, необязательно, антагониста PD-1 или PD-L1). Способ лечения субъекта, имеющего рак, раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α (и, необязательно, антагонистом PD-1 или PD-L1) может предусматривать введение субъекту, у которого есть раковые клетки или TIL-клетки, экспрессирующие PD-L1 или PD-1, терапевтически эффективного количества раскрываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α (и, необязательно, антагониста PD-1 или PD-L1). Настоящее изобретение также относится к способам прогнозирования того, будет ли субъект отвечать на лечение раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α (и, необязательно, антагонистом PD-1 или PD-L1), причем способы предусматривают определение уровня PD-L1 или PD-1 в раковых клетках или TIL-клетках пациента, и если раковые клетки или TIL-клетки субъекта являются положительными по PD-L1 или PD-1, то субъект, вероятно, будет отвечать на лечение раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α (и, необязательно, антагонистом PD-1 или PD-L1).

[00384] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят со стандартом средства лечения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят в качестве поддерживающей терапии, например, терапии, которая предназначена для предупреждения возникновения или рецидива опухолей.

[00385] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят с другим способом лечения, например, лучевой терапией, хирургическим вмешательством или химиотерапией. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вспомогательную терапию с применением описываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α проводят, если существует риск того, что могут присутствовать микрометастазы и/или для снижения риска рецидива.

[00386] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят в виде монотерапии или в виде единственной иммуностимулирующей терапии. Антитела к IL2R α можно объединить в комбинацию с иммуногенным средством, таким как раковые клетки, очищенные опухолевые

антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He *et al.*, (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые можно применять, включают пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназа, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (дополнительно рассмотрено ниже).

[00387] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α совмещают с протоколом вакцинации. Было разработано множество экспериментальных стратегий вакцинации против опухолей (см. работы Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C, 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 730-738; см. также работы Restifo, N. and Sznol, M., *Cancer Vaccines*, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita *et al.* (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Fifth Edition). В соответствии с одной из этих стратегий, вакцину готовят с применением аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что такие клеточные вакцины наиболее эффективны при тансдукции опухолевых клеток для экспрессии GM-CSF. Было показано, что GM-CSF является мощным активатором презентирования антигена при опухолевой вакцинации (Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

[00388] Изучение генной экспрессии и крупномасштабных паттернов генной экспрессии в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифических антигенов (Rosenberg, S A (1999) *Immunity* 10: 281-7). Во многих случаях эти опухолеспецифические антигены являются антигенами дифференцировки, которые экспрессируются в опухолях и в клетке, из которой возникла опухоль, например, антигены меланоцитов gp100, антигены MAGE и Trp-2. Что еще важнее, можно продемонстрировать, что многие из этих антигенов являются целями для опухолеспецифических Т-клеток у хозяина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α применяют в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессируемых в опухоли, с целью создания иммунного ответа на такие белки. Эти белки обычно воспринимаются иммунной системой как «свои» антигены, и поэтому она толерантна к ним. К опухолевому антигену можно отнести белковую теломеразу, которая необходима для синтеза теломер

хромосом и которая экспрессируется при более чем 85% случаев рака человека и лишь в ограниченном количестве соматических тканей (Kim *et al.* (1994) *Science* 266: 2011-2013). Опухолевый антиген также может быть «неоантигенами», которые экспрессируются в раковых клетках из-за соматических мутаций, которые изменяют белковую последовательность или создают слитые белки между двумя неродственными последовательностями (т. е. bcr-abl в филадельфийской хромосоме), или идиотипом из В-клеточных опухолей.

[00389] Другие опухолевые вакцины могут включать белки от вирусов, связанных с развитием форм рака у человека, таких как папилломавирус человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус саркомы герпеса Капоши (KHSV). Другая форма опухолеспецифического антигена, которую можно применять в сочетании с слитым белком по настоящему раскрытию, представляет собой очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой опухолевой ткани. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и такие HSP обладают высокой эффективностью в доставке к антигенпрезентирующим клеткам для индукции опухолевого иммунитета (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269: 1585-1588; Tamura *et al.* (1997) *Science* 278: 117-120).

[00390] Дендритные клетки (DC) являются высокоэффективными антигенпрезентирующими клетками, которые можно применять для инициирования антигенспецифических ответов. DC можно получить *ex vivo* и загрузить различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). DC также можно трансдуцировать генетическими средствами для экспрессии этих опухолевых антигенов. DC также были слиты непосредственно с опухолевыми клетками с целью иммунизации (Kugler *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). В качестве способа вакцинации иммунизацию DC можно эффективно сочетать с раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α для активации более высокоэффективных противоопухолевых ответов.

[00391] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы лечения рака с применением раскрываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α сочетают в комбинации со стандартными способами лечения рака (например, хирургическим вмешательством, облучением и химиотерапией). Примером такой комбинации является антитело к TIM3 в комбинации с раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α для лечения меланомы. Научное обоснование комбинированного применения раскрываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α и химиотерапии заключается

в том, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к повышенным уровням опухолевого антигена в антигенпрезентирующем пути. Другими комбинированными способами терапии, которые могут приводить к синергизму с раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α посредством гибели клеток, являются облучение, хирургическое вмешательство и выключение эндокринной функции. Каждый из этих протоколов создает источник опухолевого антигена у хозяина. Ингибиторы ангиогенеза также можно сочетать в комбинации с раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α . Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, что может служить источником опухолевого антигена в антигенпрезентирующих путях хозяина.

[00392] Слитый белок IL2/IL2R α , раскрываемый в настоящем документе и описываемый в настоящем документе, также можно применять в комбинации с биспецифическими антителами, которые нацеливают эффекторные клетки, экспрессирующие рецептор Fc α или Fc γ , на опухолевые клетки (см., например, патенты США № 5922845 и № 5837243). Биспецифические антитела можно применять для нацеливания на два отдельных антигена. Например, биспецифические антитела к рецептору Fc/опухолевому антигену (например Her-2/neu) были использованы для нацеливания макрофагов на места локализации опухоли. Такое целенаправленное воздействие может более эффективно активировать опухолеспецифические ответы. Альтернативно, антиген может быть доставлен непосредственно к DC с использованием биспецифических антител, которые связываются с опухолевым антигеном и маркером на клеточной поверхности, который специфичен для дендритных клеток.

[00393] Опухоли уклоняются от иммунологического надзора хозяина с помощью большого количества механизмов. Многие из этих механизмов могут быть преодолены путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммунодепрессивными. К ним относятся, среди прочего, TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) и Fas ligand (Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). Антитела к каждой из этих молекул можно применять в комбинации с раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α для противодействия действиям иммунодепрессантов и стимуляции противоопухолевых иммунных ответов, вырабатываемых хозяином.

[00394] В комбинации с раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α можно применять и другие антитела, которые активируют иммунологическую реактивность хозяина. К ним относятся молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функционирование DC и презентирование антигена. Антитела к CD40 способны эффективно замещать активность хелперных Т-клеток (Ridge *et al.* (1998) *Nature* 393: 474-478), и их можно применять в сочетании с раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α . Активация антител к костимулирующим молекулам Т-клеток, таким как CTLA-4 (например, патент США № 5811097), OX-40 (Weinberg *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997) и ICOS (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397: 262-266) также может обеспечить повышенные уровни активации Т-клеток. Также в сочетании с раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α можно применять ингибиторы PD1 или PD-L1. В других разделах настоящего документа представлены и другие комбинации.

[00395] Для лечения различных опухолей гемопоэтического происхождения в настоящее время применяют трансплантацию костного мозга. Хотя последствием этого лечения является болезнь «трансплантат против хозяина», в результате ответов «трансплантат против опухоли» можно получить терапевтический эффект. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α применяют для повышения эффективности донорских привитых опухолеспецифических Т-клеток.

[00396] Существуют также несколько экспериментальных протоколов лечения, которые предусматривают *ex vivo* активацию и размножение антигенспецифических Т-клеток и адоптивный перенос этих клеток реципиентам для стимуляции антигенспецифических Т-клеток против опухоли (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Эти способы также можно применять для активации Т-клеточных ответов на инфекционные агенты, такие как CMV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, активация *ex vivo* в присутствии раскрываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α может увеличивать частоту и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

7.7.2.2 Воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание

[00397] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в том

субъекта, причем заболевание или нарушение представляет собой воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества раскрываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α .

[00398] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят пациентам, имеющим воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание, которые характеризовались неадекватным ответом на предшествующее лечение или продолжало прогрессировать после него. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят пациентам, которые ранее не получали (т. е. не проходили) лечение от воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания.

[00399] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят со стандартом средства лечения от воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят в качестве поддерживающей терапии от воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания, например, терапии, которая предназначена для предупреждения возникновения или рецидива воспаления.

[00400] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят в качестве монотерапии для лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания или в качестве только иммуностимулирующей терапии для лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α сочетают в комбинации с протоколом вакцинации для лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α сочетают в комбинации с антителом, применяемым для лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания.

[00401] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из сахарного диабета 1-го типа, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, глютеиновой болезни, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, кожной волчанки, ювенильного

идиопатического артрита, болезни Крона, язвенного колита или склеродермии, болезни «трансплантат против хозяина», псориаза, очаговой алопеции, HCV-индуцированного васкулита, синдрома Шегрена, пузырчатки, анкилозирующего спондилоартрита, болезни Бехчета, гранулематоза Вегенера, синдрома Такаясу, аутоиммунного гепатита, склерозирующего холангита, синдрома Гужеро-Шегрена и активации макрофагов.

7.7.2.3 Инфекционное заболевание

[00402] Описываемые в настоящем документе способы также можно применять для лечения пациентов, подвергшихся воздействию определенных токсинов или патогенов. Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в том субъекта, причем заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества раскрываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α для лечения инфекционного заболевания.

[00403] Подобно его применению в отношении опухолям, как рассмотрено выше, способы, предусматривающие лечение раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α , применяют отдельно или в качестве вспомогательных в комбинации с вакцинами для стимуляции иммунного ответа на патогены, токсины и аутоантигены. Примеры патогенов, для которых данный терапевтический подход может быть особенно полезен, включают патогенов, против которых в настоящее время нет эффективной вакцины, или патогенов, против которых обычные вакцины не полностью эффективны. К ним относятся, помимо прочего, ВИЧ, гепатит (А, В и С), грипп, герпес, лямблии, малярия, лейшмания, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

[00404] Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, которые можно лечить описываемыми в настоящем документе способами, включают ВИЧ, вирус гепатита (А, В или С), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барра), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, коксаки-вирус, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, вирус HTLV, вирус денге, папилломавирус, вирус моллюска, полиовирус, вирус бешенства, JC вирус и вирус арбовирусного энцефалита.

[00405] Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, которые можно лечить описываемыми в настоящем документе способами, включают хламидию, риккетсиозную бактерию, микобактерию, стафилококк, стрептококк, пневмококк, менингококк и гонококк, клебсиеллу, протейю, серратию, псевдомоны, легионеллу, дифтерию, сальмонеллу, бациллу, холеру, tetanus, ботулизм, сибирскую язву, чуму, лептоспироз и бактерию, вызывающую болезнь Лайма.

[00406] Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, которые можно лечить описываемыми в настоящем документе способами, включают представителя рода *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т. д.), *Cryptococcus neoformans*, представителя рода *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т. д.), представителя рода *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

[00407] Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, которые можно лечить описываемыми в настоящем документе способами, включают *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* и *Nippostrongylus brasiliensis*.

[00408] Во всех вышеупомянутых способах лечение раскрываемым в настоящем документе слитым белком IL2/IL2R α можно сочетать в комбинации с другими формами иммунотерапии, например, описываемыми в настоящем документе, такими как лечение цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2) или терапия биспецифическими антителами, которая обеспечивает улучшенное презентирование опухолевых антигенов (см., например, Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2: 1121-1123).

7.7.2.4 Вакцины

[00409] Раскрываемые в настоящем документе слитые белки IL2/IL2R α можно применять для стимуляции антигенспецифических иммунных ответов путем совместного введения раскрываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α с представляющим интерес антигеном (например, вакциной). Соответственно, настоящее изобретение относится к способам усиления иммунного ответа на антиген у субъекта, предусматривающим введение субъекту: (i) антигена; и (ii) раскрываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α с

тем, чтобы усилить иммунный ответ на антиген у субъекта. Антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген патогена. Неограничивающие примеры таких антигенов включают рассмотренные в разделах выше, такие как рассмотренные выше опухолевые антигены (или противоопухолевые вакцины) или антигены описанных выше вирусов, бактерий или других патогенов.

[00410] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пептидный или слитый белок, содержащий эпитоп, с которым связывается раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α , применяют в качестве вакцины вместо раскрываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α или в дополнение к нему.

[00411] Подходящие пути введения композиций антител (например, моноклональных антител человека, мультиспецифических и биспецифических молекул и иммуноконъюгатов), раскрываемых в настоящем документе, *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в настоящей области техники и могут быть выбраны специалистами в настоящей области техники. Например, композиции антител можно вводить путем инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие дозировки применяемых молекул будут зависеть от возраста и массы субъекта, а также от концентрации и/или состава композиции антител.

7.7.2.5 Совместное введение со вторым средством

[00412] Как описано ранее, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α можно вводить совместно с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, например, цитотоксическим средством, радиотоксичным средством или иммунодепрессантом. Раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α может быть связан со средством (в виде иммунокомплекса), или его можно вводить отдельно от средства. В последнем случае (раздельное введение) раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α можно вводить до, после или одновременно со средством или можно вводить совместно с другими известными средствами терапии, например, со средством противораковой терапии, например, облучением. Такие терапевтические средства включают, среди прочего, противоопухолевые средства, такие как доксорубин (адриамицин), цисплатин, блеомицин сульфат, кармустин, хлорамбуцил, дакарбазин и циклофосфамидгидроксимочевина, которые сами по себе эффективны только на уровнях, токсичных или субтоксичных для пациента. Цисплатин внутривенно вводят дозой 100 мг/мл раз в четыре недели, а адриамицин вводят внутривенно дозой 60-75 мг/мл раз в 21 сутки.

Совместное введение раскрываемого в настоящем документе слитого белка IL2/IL2R α с химиотерапевтическими средствами обеспечивает присутствие двух противораковых средств, которые действуют посредством различных механизмов, что дает цитотоксический эффект на опухолевые клетки человека. Такое совместное введение может решить проблемы, связанные с развитием устойчивости к лекарственным средствам или изменением антигенности опухолевых клеток, что сделало бы их инертными с антителом.

[00413] Настоящее изобретение относится к способам комбинированной терапии, в которых раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят совместно с одним или несколькими дополнительными средствами (вторым терапевтическим средством), например, низкомолекулярными лекарственными средствами, антителами или их антигенсвязывающими частями, которые эффективны при стимуляции иммунных ответов для дополнительного усиления, стимулирования или положительной регуляции иммунных ответов у субъекта.

[00414] Как правило, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α можно сочетать в комбинации с (i) агонистом стимулирующей (например, костимулирующей) молекулы (например, рецептором или лигандом) и/или (ii) антагонистом ингибирующего сигнала или молекулы (например, рецептора или лиганда) на иммунных клетках, таких как Т-клетки, что в обоих случаях приводит к усилению иммунных ответов, таких как антигенспецифические Т-клеточные ответы. Согласно некоторым аспектам, иммуноонкологическое средство представляет собой (i) агонист стимулирующей (в том числе костимулирующей) молекулы (например, рецептора или лиганда) или (ii) антагонистом ингибирующей (включая коингибирующей) молекулы (например, рецептора или лиганда) на клетках, например, на клетках, которые ингибируют активацию Т-клеток, или на клетках, которые участвуют во врожденном иммунитете, например, на NK-клетках, и причем иммуноонкологическое средство усиливает врожденный иммунитет. Такие иммуноонкологические средства зачастую называют регуляторами иммунных контрольных точек, например, ингибиторами иммунных контрольных точек или стимуляторами иммунных контрольных точек.

[00415] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят со средством, нацеленным на стимулирующую или ингибирующую молекулу, которая является представителем суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). Например, раскрываемый в настоящем документе

слитый белок IL2/IL2R α можно вводить субъекту со средством, которое нацелено на представителя семейства IgSF для повышения иммунного ответа. Например, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α можно вводить со средством, которое нацелено (или специфически связывается с) представителем семейства B7 мембраносвязанных лигандов, куда входят B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6 или костимулирующий или коингибирующий рецептор или лиганд, специфически связывающийся с представителем семейства B7.

[00416] Раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α также можно вводить со средством, которое нацелено на представителя семейства молекул TNF и TNFR (лигандов или рецепторов), такого как CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn 14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LTrpR, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDA1, EDA2, TNFR1, лимфотоксин- α /TNFR α , TNFR2, TNF α , LTrpR, лимфотоксин 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY и NGFR см., например, Tansey (2009) *Drug Discovery Today* 00:1).

[00417] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α вводят со средством, содержащим антитело к PD-1. Антитело к PD-1 может быть любым антителом, которое связывает PD-1 и ингибирует взаимодействие PD-1 и PD-L1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к PD-1 представляет собой любое известное в настоящей области техники антитело к PD-1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой ниволумаб. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой пембролизумаб.

[00418] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой антитело к PD-L1. Антитело к PD-L1 может быть любым антителом, которое связывает PD-L1 и ингибирует взаимодействие PD-1 и PD-L1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к PD-L1 представляет собой любое известное в настоящей области техники антитело к PD-L1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой атезолизумаб. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой дурвалумаб. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой авелумаб.

[00419] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой антитело к CTLA-4. Антитело к CTLA-4 может быть любым антителом, которое связывает CTLA-4 и ингибирует его активность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к CTLA-4 представляет собой любое известное в настоящей области техники антитело к CTLA-4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой тремелимумаб. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой ипилимумаб.

[00420] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой антитело к LAG3. Антитело к LAG3 может быть любым антителом, которое связывает LAG-3 и ингибирует его активность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к LAG3 представляет собой любое известное в настоящей области техники антитело к LAG3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой 25F7.

[00421] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой антитело к CD137. Антитело к CD137 может быть любым антителом, которое связывает CD137 и ингибирует его активность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к CD137 представляет собой любое известное в настоящей области техники антитело к CD137. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой урелумаб.

[00422] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой антитело к KIR. Антитело к KIR может быть любым антителом, которое связывает KIR и ингибирует его активность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к KIR представляет собой любое известное в настоящей области техники антитело к KIR. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой лирилумаб.

[00423] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой антитело к GITR. Антитело к GITR может быть любым антителом, которое связывает GITR и ингибирует его активность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к GITR представляет собой любое известное в настоящей области техники антитело к GITR. В соответствии с некоторыми вариантами

осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой МК4166. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой TRX518.

[00424] В соответствии с другими вариантами осуществления, вторая терапия предусматривает введение антитела к TIM3. Антитело к TIM3 может быть любым антителом, которое связывает TIM3 и ингибирует его активность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к TIM3 представляет собой любое известное в настоящей области техники антитело к TIM3.

[00425] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вторая терапия предусматривает введение химиотерапевтического средства. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, химиотерапевтическое средство выбрано из ингибитора протеосом, иммуномодулирующего лекарственного средства (IMiD), ингибитора Vet и любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ингибитор протеосом выбран из бортезомиба, иксазомиба, карфилзомиба, опрозомеиба и маризомеиба. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ингибитор протеосом представляет собой бортезомиб.

[00426] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вторая терапия предусматривает лучевую терапию. В качестве второй терапии можно применять любую известную в настоящей области техники лучевую терапию.

[00427] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вторая терапия предусматривает введение средства, которое активирует клетки врожденного иммунитета. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, средство, которое активирует клетки врожденного иммунитета, представляет собой агонист NLRP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, агонист NLRP3 представляет собой моногидрат моносодия урата (MSU) и/или квасцы, которые выполняют роль адъюванта для вакцины. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, средство, которое активирует клетки врожденного иммунитета, является агонистом Toll-подобного рецептора 7 (TLR7). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, агонист TLR7 представляет собой имиквимод (R837), GS-9620 (см. Tsai et al., J. Virology doi:10.1128/JVI.02166-16 (Feb. 8, 2017)), ORN R-2336 (Miltenyl Biotec) или любую их комбинацию.

[00428] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вторая терапия предусматривает введение средства, которое усиливает выживаемость натуральных киллеров (NK), CD8⁺ Т-клеток или как первых, так и вторых.

[00429] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, вторая терапия предусматривает введение средства, выбранного из группы, состоящей из доксорубина (ADRIAMYCIN®), цисплатина, карбоплатина, блеомицина сульфата, кармустина, хлорамбуцила (LEUKERAN®), циклофосфида (CYTOXAN®; NEOSAR®), леналидомида (NEOSAR®), бортезомиба (VELCADE®), дексаметазона, митоксантрона, этопозиды, цитарабина, бендамустина (TREANDA®), ритуксимаба (RITUXAN®), ифосфамида, винкристина (ONCOVIN®), флударабина (FLUDARA®), талидомида (THALOMID®), алемтузумаба (CAMPATH®), офатумумаба (ARZERRA®), эверолимуса (AFINITOR®, ZORTRESS®), карфилзомиба (KYPROLISTM) и любой их комбинации.

[00430] К иллюстративным средствам, которые модулируют один из описанных выше белков и которые можно сочетать в комбинации с описываемым в настоящем документе слитым белком для лечения рака, относятся: YERVOY® (ипилимумаб) или тремелимумаб (к CTLA-4), галиксимаб (к B7.1), BMS-936558 (к PD-1), MK-3475 (к PD-1), атезолизумаб (TECENTRIQ®), AMP224 (к B7DC), BMS-936559 (к B7-H1), MPDL3280A (к B7-H1), MEDI-570 (к ICOS), AMG557 (к B7H2), MGA271 (к B7H3), IMP321 (к LAG-3), BMS-663513 (к CD137), PF-05082566 (к CD137), CDX-1127 (к CD27), антитело к OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (к OX40L), атацепт (к TACI), CP-870893 (к CD40), лукатумумаб (к CD40), дацетузумаб (к CD40), муромонаб-CD3 (к CD3); антитела MK4166 к GITR, TRX518, Medi1873, INBRX-110, LK2-145, GWN-323, GITRL-Fc или любая их комбинация.

[00431] К другим молекулам, которые можно сочетать в комбинации с слитыми белками для лечения заболевания или нарушения, относятся антагонисты ингибирующих рецепторов на NK-клетках или агонисты активирующих рецепторов на NK-клетках. Например, описываемые в настоящем документе слитые белки можно сочетать в комбинации с антагонистами KIR (например, лирилумабом).

[00432] Т-клеточная активация также регулируется растворимыми цитокинами, и описываемые в настоящем документе слитые белки можно вводить субъекту, например, имеющему рак, с антагонистами цитокинов, которые ингибируют Т-клеточную активацию, или агонистами цитокинов, которые стимулируют Т-клеточную активацию.

[00433] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описываемые в настоящем документе слитые белки можно применять в комбинации с (i) антагонистами (или ингибиторами или блокирующими средствами) белков семейства IgSF или семейства B7 или белков семейства TNF, которые ингибируют Т-клеточную активацию, или антагонистами цитокинов, которые ингибируют Т-клеточную активацию (например, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF, «иммуносупрессорные цитокины»), и/или (ii) агонистами стимулирующих рецепторов семейства IgSF, семейства B7 или семейства TNF или цитокинов, которые стимулируют Т-клеточную активацию, для стимуляции иммунного ответа, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как рак.

[00434] К еще одним средствам для комбинированной терапии относятся средства, которые ингибируют макрофаги или моноциты или уменьшают их количество, в том числе без ограничения антагонисты CSF-1R, такие как антагонистические антитела к CSF-1R, включая RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, W013/87699, W013/119716, WO13/132044) или FPA-008 (WO11/140249; W013169264; WO14/036357).

[00435] Слитый белок по настоящему раскрытию также можно вводить со средствами, которые ингибируют передачу сигналов с участием TGF- β .

[00436] К дополнительным средствам, которые можно сочетать в комбинации с описываемым в настоящем документе слитым белком, относятся средства, которые улучшают презентирование опухолевых антигенов, например, вакцины на основе дендритных клеток, вакцины на основе клеток, секретирующих GM-CSF, олигонуклеотиды CpG и имиквимод или терапевтические средства, которые усиливают иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины).

[00437] Другим терапевтическим средством, которое можно сочетать в комбинации с описанным в настоящем документе слитым белком, является терапевтическое средство, которое ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназа (IDO), диоксигеназа, аргиназа или синтаза оксида азота.

[00438] Другой класс средств, которые можно применять с описываемым в настоящем документе слитым белком, включает средства, которые ингибируют образование аденозина, например, ингибиторы CD73, или ингибируют рецептор аденозина A2A.

[00439] К другим терапевтическим средствам, которые можно сочетать в комбинации с описываемым в настоящем документе слитым белком для лечения заболевания или нарушения, например, рака, относятся терапевтические средства, которые

обращают/предупреждают анергию или истощение Т-клеток, и терапевтические средства, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаление на месте локализации опухоли.

[00440] К другим терапевтическим средствам, которые можно сочетать в комбинации с описываемым в настоящем документе слитым белком для лечения заболевания или нарушения, например, рака, относятся терапевтические средства, которые блокируют IL-8, например, с помощью NuMax-IL8.

[00441] Описываемый в настоящем документе слитый белок можно сочетать в комбинации с более чем одним иммуноонкологическим средством и можно, например, сочетать с комбинаторным подходом, который целенаправленно воздействует на множество элементов иммунного пути, таким как одно или несколько из следующих: терапевтическое средство, которое усиливает презентирование опухолевых антигенов (например, вакцина на основе дендритных клеток, вакцины на основе клеток, секретирующих GM-CSF, олигонуклеотиды CpG, имиквимод); терапевтическое средство, которое ингибирует отрицательную иммунную регуляцию, например, путем ингибирования пути CTLA-4 и/или PD1/PD-L1/PD-L2 и/или уменьшения количества или блокировки Treg-клеток или других иммуносупрессорных клеток; терапевтическое средство, которое стимулирует положительную иммунную регуляцию, например, с агонистами, которые стимулируют путь CD-137, OX-40 и/или CD40 или GITR и/или стимулируют эффекторную функцию Т-клеток; терапевтическое средство, которое системно увеличивает частоту встречаемости противоопухолевых Т-клеток; терапевтическое средство, которое уменьшает количество или ингибирует клетки Treg, такие как клетки Treg в опухоли, например, с использованием антагониста CD25 (например, даклизумаба), или путем *ex vivo* уменьшения количества с использованием микроносителей с антителами к CD25; терапевтическое средство, которое влияет на функцию супрессорных миелоидных клеток в опухоли; терапевтическое средство, которое усиливает иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины); адоптивный перенос Т-клеток или NK-клеток, в том числе генетически модифицированных клеток, например, клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (терапия CAR-T); терапевтическое средство, которое ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназа (IDO), диоксигеназа, аргиназа или синтетаза оксида азота; терапевтическое средство, которое обращает/предупреждает анергию или истощение Т-клеток; терапевтическое средство, которое запускает активацию врожденного иммунитета

и/или воспаление на месте локализации опухоли; введение иммуностимулирующих цитокинов; или блокирование иммунорепрессорных цитокинов.

[00442] Описываемый в настоящем документе слитый белок можно применять вместе с одним или несколькими агонистическими средствами, которые лигируют положительные костимулирующие рецепторы, блокирующими средствами, которые ослабляют передачу сигналов через ингибирующие рецепторы, антагонистами и одним или несколькими средствами, которые системно увеличивают частоту встречаемости противоопухолевых Т-клеток, средствами, которые компенсируют различные иммуносупрессорные пути в опухолевом микроокружении (например, блокируют задействие ингибирующего рецептора (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), уменьшают количество или ингибируют клетки Treg (например, с помощью моноклонального антитела к CD25 (например, даклизумаба) или путем *ex vivo* уменьшения количества с помощью микроносителей с антителами к CD25), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или обращают/предупреждают анергию или истощение Т-клеток), и средствами, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаление на местах локализации опухоли.

[00443] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок по настоящему раскрытию вводят субъекту вместе с ингибитором BRAF, если субъект является положительным по мутации BRAF V600.

[00444] Например, описываемый в настоящем документе слитый белок по настоящему раскрытию и комбинированные терапии можно применять в комбинации (например, одновременно или отдельно) с дополнительным способом лечения, таким как облучение и/или химиотерапия (например, с применением камптотецина (CPT-11), 5-фторурацила (5-FU), цисплатина, доксорубицина, иринотекана, паклитаксела, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатин-паклитаксела (таксола), доксорубицина или камптотецина + аro21/TRAIL (6X combo)), один или несколько ингибиторов протеасом (например, бортезомиб или MG132), один или несколько ингибиторов Bcl-2 (например, BH3I-2' (ингибитор bcl-xl), ингибитор индоламинадиоксигеназы-1 (например, INCB24360, индоксимод, NLG-919 или F001287), AT-101 (R-(-)-производное госсипола), ABT-263 (малая молекула), GX-15-070 (обатоклас) или MCL-1 (антагонисты белка 1 дифференцировки клеток миелоидного лейкоза)), антагонисты iAP (ингибитор белка апоптоза) (например, smac7, smac4, низкомолекулярные smac-миметики, синтетические smac-пептиды (см. Fulda *et al.*, *Nat Med*

2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) или AEG-35156 (GEM-640)), ингибиторы HDAC (гистондеацетилазы), антитела к CD20 (например, ритуксимаб), ингибиторы ангиогенеза (например, бевацизумаб), антиангиогенные средства, нацеленные на VEGF и VEGFR (например, авастин), синтетические тритерпеноиды (см. Hyer *et al.*, Cancer Research 2005;65:4799-808), модуляторы c-FLIP (клеточных FLICE-ингибирующих белков) (например, природные и синтетические лиганды PPAR γ (рецептора γ , активируемого пролифератором пероксисом), 5809354 или 5569100), ингибиторы киназы (например, сорафениб), трастузумаб, цетуксимаб, темсиролимус, ингибиторы mTOR, такие как рапамицин и темсиролимус, бортезомиб, ингибиторы JAK2, ингибиторы HSP90, ингибиторы PI3K-AKT, леналилдомид, ингибиторы GSK3P, ингибиторы IAP и/или генотоксические лекарственные средства.

[00445] Описываемый в настоящем документе слитый белок по настоящему раскрытию и комбинированные терапии можно дополнительно применять в комбинация с одним или несколькими противоопролиферативными цитотоксическими средствами. Классы соединений, которые можно применять в качестве противоопролиферативных цитотоксических средств, включают без ограничения приведенные далее классы.

[00446] Алкилирующие средства (включая без ограничения азотистые иприты, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): урамустин, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN[®]), мелфалан, хлорамбуцил, пипроброман, триэтиленмеламин, триэтилентеофосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

[00447] Антиметаболиты (в том числе без ограничения антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндеаминазы): метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабинфосфат, пеностатин и гемцитабин.

[00448] Подходящими противоопролиферативными средствами для сочетания в комбинации с слитым белком по настоящему раскрытию являются без ограничения таксаны, паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен под названием TAXOL[™]), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), пелорусид А, эпотилоны, эпотилов А, эпотилов В, эпотилов С, эпотилов D, эпотилов Е, эпотилов F, фурноэпотилов D, дезоксиэпотилов В1, [17]-дегидродезоксиэпотилов В, [18]-дегидродезоксиэпотиловы В, С12,13-циклопропилэпотилов А, С6-С8-мостиковый эпотилов А, транс-9,10-дегидроэпотилов D, цис-9,10-дегидроэпотилов D, 16-десметилэпотилов В, эпотилов В10, дискодермолид, патупилов

(ЕРО-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-ЕРО, ABJ-789, ХАА296А (дискодеромолид), TZT-1027 (соблидотин), ILX-651 (тасидотин гидрохлорид), галихондрин В, эрибулина мезилат (Е-7389), гемиастерлин (НТИ-286), Е-7974, цирптофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты майтанзиноида (DM-1), MKC-1, АВТ-751, TI-38067, Т-900607, SB-715992 (испинезиб), SB-743921, МК-0731, STA-5312, элеутеробин, 17-бета-ацетокси-2-этокси-6-оксо-В-гомо-эстра-1,3,5(10)-триен-3-ол, циклострептин, изолаулималид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-дидеметил-(+)-дискодермолиды и криптотилон 1, помимо других стабилизирующих микротубулин средств, которые известны из уровня техники.

[00449] В тех случаях, когда желательно сделать аберрантно пролиферирующие клетки неактивными в сочетании с лечением описываемым в настоящем документе слитым белком по настоящему раскрытию или до него, пациенту также можно вводить гормоны и стероиды (включая синтетические аналоги), такие как 17а-этинилэстрадиол, диэтилстилбестрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместерон, дромостанолон пропионат, тестолактон, мегестролацетат, метилпреднизолон, метилтестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлортианизен, гидроксипрогестерон, аминоклутетимид, эстрамустин, медроксипрогестеронацетат, лейпролид, флутамид, торемифен, ZOLADEx®. При использовании описываемых в настоящем документе способов или композиций в случае необходимости можно вводить и другие средства, применяемые при модуляции опухолевого роста или метастазирования в клинических условиях, такие как антимиометики.

[00450] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, комбинацию слитого белка по настоящему раскрытию и второго средства, рассмотренного в настоящем документе, можно вводить одновременно в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций с слитым белком по настоящему раскрытию и вторым средством в фармацевтически приемлемом носителе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, комбинацию слитого белка по настоящему раскрытию и второго средства можно вводить последовательно. Введение двух средств может начинаться в различные моменты времени, например, с разницей в 30 минут, 60 минут, 90 минут, 120 минут, 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 3 суток, 5 суток, 7 суток или одну или несколько недель друг от друга, или введение второго средства может начаться, например, спустя 30 минут, 60 минут, 90 минут, 120 минут, 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 3 суток, 5 суток, 7 суток или одну или несколько недель после того, как было введено первое средство.

[00451] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, к противоопухолевому антителу, которое можно сочетать в комбинации с слитым белком по настоящему раскрытию и/или вторым средством, относятся RITUXAN® (ритуксимаб), HERCEPTIN® (транстузумаб), BEXXAR® (тоситумомаб), ZEVALIN® (ибритумомаб), CAMPATH® (алемтузумаб), LYMPHOCIDE® (эпртузумаб), AVASTIN® (бевацизумаб) и TARCEVA® (эрлотиниб) или любая их комбинация. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе антитело, пригодное для комбинированной терапии с слитым белком по настоящему раскрытию, может представлять собой конъюгат антитела и лекарственного средства.

[00452] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок по настоящему раскрытию отдельно или в комбинации с другим средством применяют одновременно или последовательно с трансплантацией костного мозга для лечения различных опухолей гематопоезического происхождения.

[00453] Настоящее изобретение относится к способам изменения неблагоприятного явления, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания (например, рака) иммуностимулирующим средством, предусматривающим введение субъекту слитого белка по настоящему раскрытию со вторым средством или без него. Например, описываемые в настоящем документе способы предусматривают способ уменьшения частоты индуцированного иммуностимулирующим терапевтическим антителом колита или диареи путем введения пациенту неабсорбируемого стероида. Применяемый в настоящем документе термин «неабсорбируемый стероид» обозначает глюкокортикоид, который характеризуется обширным пресистемным метаболизмом так, чтобы после метаболизма в печени биодоступность стероида была низкой, т. е. менее приблизительно 20%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, неабсорбируемым стероидом является будесонид. Будесонид представляет собой локально действующий глюкокортикостероид, который интенсивно метаболизируется, прежде всего печенью, после перорального введения. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) представляет собой зависимый от pH и времени пероральный состав с будесонидом, разработанный для оптимизации доставки лекарственного средства в подвздошную кишку и по всей длине толстой кишки. ENTOCORT EC® одобрен в США для лечения болезни Крона легкой - умеренной степени тяжести с вовлечением подвздошной кишки и/или восходящей ободочной кишки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, слитый белок по

настоящему раскрытию в сочетании с неабсорбируемым стероидом можно дополнительно сочетать в комбинации с салицилатом. К салицилатам относятся средства 5-ASA, такие как, например: сульфасалазин (AZULFIDINE[®], Pharmacia & Up John); олсазалин (DJPENTUM[®], Pharmacia & Up John); балсалазид (COLAZAL[®], Salix Pharmaceuticals, Inc.); и мезаламин (ASACOL[®], Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA[®], Шир, США; CANASA[®], Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA[®], Сольве).

7.8 Наборы

[00454] В контексте настоящего документа набор содержит слитый белок IL2/IL2R α для применения при модулировании иммунного ответа, как описано в других разделах настоящего документа. Термины «набор» и «система» в контексте настоящего документа предназначены для обозначения по меньшей мере одного или нескольких слитых белков IL2/IL2R α , которые, в соответствии с конкретными вариантами осуществления, представлены в комбинации с одним или несколькими элементами или компонентами другого типа (например, биохимическими реагентами, емкостями, упаковками другого типа, такими как упаковочный материал, предназначенный для коммерческой продажи, инструкции по применению и тому подобное).

[00455] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к набору, содержащему (а) один или несколько описываемых в настоящем документе слитых белков IL2/IL2R α , композицию, содержащую описываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α , нуклеиновую кислоту, кодирующую описываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α , вектор и/или клетку-хозяина; и (b) и инструкции по введению слитого белка нуждающемуся в том субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к набору, содержащему (а) описываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α и (b) инструкции по введению слитого белка нуждающемуся в том субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к набору, содержащему (а) композицию, содержащую описываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α , и (b) инструкции по введению композиции нуждающемуся в том субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к набору, содержащему (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую описываемый в настоящем документе слитый белок IL2/IL2R α , и (b) инструкции по введению нуклеиновой кислоты

нуждающемуся в том субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к набору, содержащему (а) описываемый в настоящем документе вектор и (b) инструкции по введению вектора нуждающемуся в том субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к набору, содержащему (а) описываемую в настоящем документе клетку-хозяина и (b) инструкции по введению клетки-хозяина нуждающемуся в том субъекту.

[00456] В соответствии с конкретным вариантом осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической упаковке или набору, которые содержат одну или несколько емкостей, заполненных одним или несколькими ингредиентами описываемых в настоящем документе фармацевтических композиций, такими как один или несколько представленных в настоящем документе слитых белков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, наборы содержат описываемую в настоящем документе фармацевтическую композицию и любое профилактическое или терапевтическое средство, такое как те средства, которые описаны в настоящем документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления, наборы могут содержать Т-клеточный митоген, такой как, например, фитогемагглютинин (PHA) и/или форболмиристатацетат (PMA), или антитело, стимулирующее образование комплекса с TCR, такое как антитело к CD3 и антитело к CD28. С такой одной или несколькими емкостями необязательно может быть связано уведомление в форме, предписанной правительственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, причем в таком уведомлении отображено одобрение органом производства, применения или продажи для введения человеку.

[00457] Также в настоящем документе представлены наборы, которые можно применять в соответствии с описанными выше способами. В соответствии с одним вариантом осуществления, набор содержит описываемый в настоящем документе слитый белок, предпочтительно очищенный слитый белок, в одной или нескольких емкостях. В соответствии с конкретным вариантом осуществления, описываемые в настоящем документе наборы содержат практически изолированный слитый белок в качестве контроля. В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, описываемые в настоящем документе наборы дополнительно содержат контрольное антитело или контрольный слитый белок, которые не вступают в реакцию с антигеном IL2 и/или IL2-R α . В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, описываемые в настоящем документе наборы содержат один или

несколько элементов для детекции связывания слитого белка с антигеном IL2 и/или IL2-R α (например, слитый белок может быть конъюгирован с детектируемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, субстрат для фермента, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или с детектируемым субстратом может быть конъюгировано второе антитело, которое распознает первое антитело). В соответствии с конкретными вариантами осуществления, представленный в настоящем документе набор может включать полученный рекомбинантными методами или химически синтезированный слитый белок. К твердой подложке также может быть прикреплен и антиген для раскрываемого в настоящем документе слитого белка, который представлен в наборе. В соответствии с более конкретным вариантом осуществления, к детектирующему средству из описанного выше набора относится твердая подложка, к которой прикреплен антиген слитого белка. Такой набор также может включать неприкрепленное, меченное репортером антитело к человеческим антигенам или антител к мышинным/крысиным антигенам. В соответствии с данным вариантом осуществления, связывание слитого белка с антигеном можно детектировать по связыванию указанного меченного репортером антитела.

[00458] При реализации на практике настоящего раскрытия будут использоваться, если не указано иное, традиционные методики клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в настоящей области техники. Такие методики полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* патент США № 4683195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N. Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., (1986); Crooks, Antisense drug Technology: Principles, strategies and applications, 2nd Ed. CRC Press (2007), и в публикации Ausubel *et al.* (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[00459] Все упомянутые выше источники, а также все упомянутые в настоящем документе источники и аминокислотные или нуклеотидные последовательности (например, под номерами GenBank и/или под номерами Uniprot) полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

[00460] Представленные ниже примеры предложены в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

8. ПРИМЕРЫ

Пример 1

Слитый белок IL2-CD25 образует стабильный гомогенный гомодимер

[00461] Размер и олигомерное состояние слитых белков изучали с помощью эксклюзионной хроматографии, сопряженной со встроенным детектором многоугольного светорассеяния (SEC-MALS). Образцы подготавливали путем инъекции 30 мкг исходного образца белка. Изократическое разделение выполняли на колонке GE Healthcare Superdex 200 Increase 10/300 GL (10 мм × 300 мм), подключенной к UFLC-системе Prominence Shimadzu, состоящей из дегазатора, изократической помпы, держателя охлажденных образцов с инжектором, детектора УФ/видимого спектра и термостата колонки в буфере, содержащем 40 mM Tris, 200 mM NaCl (pH 7,5) с 0,02% азидом натрия, добавленным и профильтрованным через 0,1 мкм фильтр со скоростью потока 0,75 мл/мин. Образцы вводили инъекцией в колонку с помощью автоматического пробоотборника Shimadzu, а данные получали от трех соединенных последовательно онлайн-детекторов: двухволнового спектрофотометра УФ/видимого спектра SPD-20 от Shimadzu, установленного для сбора данных с длиной волны 280 нм, далее шел детектор трехугольного рассеяния лазерного света mini-Dawn TREOS от Wyatt Technologies и интерферометрический рефрактометр T-rEX Optilab от Wyatt. Данные собирали и анализировали с помощью программного обеспечения Astra 6 (Wyatt) и LabSolutions Lite (Shimadzu).

[00462] Из данных, представленных на фиг. 1, видна типичная зависимость абсолютной массы от времени элюирования, полученная по результатам аналитической эксклюзионной хроматографии. Образец, проанализированный на фиг. 1, относится к IL2-

CD25(22-212) (SEQ ID NO:16), слитому с His-меткой (GGHHHHHH) (SEQ ID NO:100), которая имеет теоретическую молекулярную массу 37812 (уменьшенную) для полипептидной цепи. Из данных видно, что IL2-CD25(22-212) образует однородную форму по всему профилю элюирования с измеренной абсолютной массой 93 кДа. На пике элюирования не наблюдали ни мономерных, ни олигомерных форм более высокого порядка, чем в основном пике. Значение массы 93 кДа указывало на то, что молекула образует гомодимер, а также гликозилирована (приблизительно на 18 масс. % от известных сайтов N- и O-сцепленного гликозилирования на IL2 и CD25).

Пример 2

Слитые белки IL2-CD25 эквивалентно связываются с гетерорецепторами sCD25 и sIL2R β /IL2R γ с ослабленной наблюдаемой аффинностью

[00463] Исследования с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) проводили на приборе Biacore T100 и/или T200 (GE Healthcare) при 25°C. Связывание аналитов слитого белка тестировали в фосфатно-солевом буфере (PBS-T) (pH 7,1) на поверхностях, состоящих из (~300RU) biot-hCD25-BioP-TVMV-His с низкой плотностью, у которых был отщеплен His (hCD25) и которые были захвачены на стрептавидиновом, т. е. SA, сенсорном чипе, или из гетеродимерного Fc-участка слияния hCD122(27-241)-hFc-D/hCD132(23-263)-hFc-K (hIL2-R β /g), который был захвачен с помощью белка A, иммобилизованного на поверхности сенсорного чипа CM5 с использованием стандартной химической реакции с этил(диметиламинопропил)карбодиимидом/N-гидроксисукцинимидом (NHS) с блокированием этаноламином. Аналиты белка вводили инъекцией серией титров, а регенерацию до исходного уровня проводили путем инъекции 2 $\times$ 8 буфера с низким pH. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Biacore T-200 Evaluation.

[00464] На фиг. 2 показано прототипное связывание слитого белка IL2-CD25 (SEQ ID NO:16) с sCD25 человека. Наблюдаемая кажущаяся равновесная константа диссоциации, составлявшая 4,2 микромоля, была примерно в 150 раз слабее, чем аффинность выделенного IL2 к sCD25, измеренная с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Liparoto, S. F., Myszk, D. G., Wu, Z., Goldstein, B., Laue, T. M., и Ciardelli, T. L. (2002) Biochemistry 41, 2543-51.).

Таблица 9. Фармакокинетика связывания слитого белка IL2-CD25(SEQ ID NO:16) с sCD25 человека

ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
1,29E+4	0,054	4,2E-6

[00465] В таблице 10 ниже показаны наблюдаемые у прототипов значения равновесной K_D для коротких и длинных версий IL2-CD25 к sCD25 человека и гетеродимера sIL2R β /IL2R γ . Наблюдаемые кажущиеся равновесные константы диссоциации для различных слитых белков IL2-CD25 были заметно слабее по сравнению с IL2. Связывание с sCD25 было примерно в 100 раз слабее для молекул слияния IL2-CD25 по сравнению с IL2. Аналогично, связывание слитых белков IL2-CD25 было приблизительно в 150 раз слабее с гетеродимером бета-гамма, чем с IL2.

Таблица 10. Наблюдаемые значения равновесной K_D для связывания конструкций IL2 и IL2-CD25 с sCD25 или гетеродимером sIL2R β /IL2R γ по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Рецептор	K_D с sCD25, мкМ	K_D с гетеродимером sIL2R β /IL2R γ , мкМ
IL2	0,025	0,0004
IL2-CD25(22-187)	1,6	0,054
IL2-CD25(22-212)	2,3	0,065
IL2-CV-CD25(22-240)	2,1	0,063
IL2-CD25(22-240)	2,4	0,044
Fc1.1-7linker-IL2-CD25(22-212), двухвалентная, SEQ ID NO:67	5,6	N.D.
IL2-CD25(22-212)-Fc1.1 SEQ ID NO:68	2,5	0,1
IL2-T3A-CD25(22-187)-N89Q-T95A-T106A (SEQ ID NO:202)	1,9	N.D.

Fc-(IL2(V91K)CD25)2, двухвалентная SEQ ID NO:203	3,0	
HSA-(G4S)3-IL2-CD25(22-187) SEQ ID NO:19	4,0	0,03
IL2(C145A)-CD25(22-212)-GG-HSA SEQ ID NO:20	2,1	0,03
Человеческий Fc1.1(f)-AZ1-IL2(C145S)- CD25(22-187)-G SEQ ID NO:26	3,0	0,15
IL2(C145S)-CD25(22-187)- HuFc1.1(f)-AZ1 SEQ ID NO:27	2,0	0,15
IL2(V111K)-CD25 SEQ ID NO:69	1,9	
IL2(D40T)-CD25 SEQ ID NO:70	2,8	

Пример 3

Укороченные версии IL2-CD25 обладают повышенной стабильностью в отношении агрегации: ускоренное тестирование стабильности

[00466] Стабильность слитых белков проверяли путем инкубации при 40°C в буферах с диапазоном pH 4-8. Белки слиния концентрировали приблизительно до 15 мг/мл и подвергали диализу при 4°C в следующие буферы: 1) 20 mM ацетат, 250 mM сахароза, pH 4, 2) 20 mM цитрат, 250 mM сахароза, pH 5, 3) 20 mM гистидин, 250 mM сахароза, pH 6, 4) 20 mM фосфат, 250 mM сахароза, pH 7 и 5) 20 mM Tris, 250 mM сахароза, pH 8,4 (комнатная температура). После выделения в результате концентрацию слитых белков нормализовали до 10 мг/мл путем разведения диализным буфером и помещали в термостат, контролируемый на уровне 40°C, на четыре недели, аликвоты брали непосредственно перед инкубацией (t0), через одну неделю (1w) и через четыре недели (4w) от начала инкубации при 40°C. Аликвоту каждого момента времени анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке Shodex KW403-4F, подключенной к системе для HPLC Agilent 1260 в буфере, содержащем 100 mM фосфата натрия, 150 mM хлорида натрия, pH 7,3 (профильтрованном через 0,2 мкм-фильтр), проводимой при скорости потока 0,30 мл/мин.

[00467] Как видно из таблиц 11 и 12, укороченные версии IL2-CD25 после ускоренных исследований на стабильность характеризовались гораздо лучшими высокомолекулярными и низкомолекулярными профилями, чем более длинные версии. Это особенно верно для значений pH 4, 5, 6 и 7. Образцы выдерживали при различных условиях pH в течение четырех недель и сорока градусов Цельсия. Результаты, представленные в виде процентов высокомолекулярных и низкомолекулярных фракций каждой конструкции, указывали на значительно улучшенную стабильность коротких конструкций по сравнению с длинными. Результаты, представленные в виде процентов основных пиковых фракций каждой конструкции, указывали на значительно улучшенную стабильность коротких конструкций по сравнению с длинными.

Таблица 11. Профили стабильности по результатам ускоренного испытания слитых белков IL2-CD25

	IL2-CD25(22-187)		IL2-CD25(22-212)		IL2-C145V-CD25(22-240)		IL2-CD25(22-240)	
pH	HMW (%)	LMW (%)	HMW (%)	LMW (%)	HMW (%)	LMW (%)	HMW (%)	LMW (%)
4	2,3	6,3	5,3	3,4	19,4	5,7	13,0	13,4
5	1,9	3,9	1,8	1,9	12,5	0,3	14,3	2,6
6	1,3	2,2	1,9	1,2	13,3	0,0	15,9	0,0
7	5,1	3,8	2,6	2,5	9,4	2,3	10,5	2,5
8	5,5	4,2	2,6	2,7	6,2	2,3	7,8	2,7

Слитые белки IL2-CD25 по настоящему изобретению содержат His-метку (GGHHHHHH, SEQ ID NO:100) для облегчения очистки.

Таблица 12. Профили стабильности по результатам ускоренного испытания слитых белков IL2-CD25

pH	IL2-CD25(22-187)	IL2-CD25(22-212)	IL2-C145V-CD25(22-240)	IL2-CD25(22-240)
4	91,4	91,3	74,9	73,6
5	94,2	96,4	87,2	83,1

6	96,6	97,0	86,7	84,1
7	91,1	94,9	88,3	87,0
8	90,3	94,7	91,6	89,5

Пример 4

Фармакокинетические исследования на отличных от человека животных

[00468] Фармакокинетические исследования: все протоколы на животных были одобрены Центральным комитетом по содержанию и использованию животных в Нью-Джерси, а животные были размещены в соответствии с руководствами. Самок Balb/C мышей массой 19-20 граммов приобретали у Charles-River (Уильмингтон, Массачусетс). Покормленным мышам Balb/C вводили однократную дозу 0,5 мг/кг указанной молекулы либо внутривенным (IV) путем через хвостовую вену, либо подкожным путем (SC). IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-240), использованная в фармакокинетических исследованиях, несла His6-метку. После введения дозы кровь из хвостовой вены забирали в следующие моменты времени: 5 минут (только в случае IV), 1 ч, 7 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч и 168 ч. Для PK исследования на обезьянах самцов яванских макаков приобретали у Buckshire Corporation (Перкаси, Пенсильвания). Обезьянам (N=3, средняя масса тела 7,8 кг) вводили однократную подкожную дозу 0,075 мг/кг конструкции hIL2-CD25(22-212). У обезьян, которые были в сознании и были зафиксированы на стуле, из бедренной артерии брали серийные образцы крови через 5 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 168 ч, 192 ч и 240 ч после введения дозы. Образцам крови давали свернуться и центрифугировали их при 4°C (1500–2000×g) для получения сыворотки. Образцы сыворотки хранили при -80°C до дальнейшего анализа.

[00469] Детектирование слитого белка в сыворотке: для детектирования уровней слитого белка в образцах сыворотки крови мыши или обезьяны использовали анализ связывания лиганда. Вкратце: 96-луночные плоскодонные планшеты Nunc MaxdiSorp (Thermo Fisher Scientific, Дания) покрывали захватывающим реагентом (крысиным антителом к человеческому IL2, моноклональным клоном: MQ1-17H12; Thermo Fisher Scientific, Сан-Диего, Калифорния) в количестве 2 мкг/мл в PBS в течение ночи при температуре 4°C. Планшеты блокировали блокирующим буфером (5% BSA в PBS) и инкубировали при температуре 25°C в течение одного часа. Стандарты, контроли качества (QC) и образцы разводили в 20 раз аналитическим буфером (PBS с 1% BSA и 0,05% Tween 20), вносили в промытые планшеты в двух повторностях и инкубировали при температуре 4°C в течение

ночи. Промытые планшеты инкубировали с детектирующим реагентом (человеческое биотинилированное антитело к CD25, R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, в количестве 250 нг/мл в аналитическом буфере) и инкубировали в течение 2 часов при температуре 25°C. В промытые планшеты вносили последовательно при температуре 25°C комплекс нейтравидин-HRP (Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс) в количестве 100 нг/мл в аналитическом буфере в течение 45 минут с последующим внесением смеси хемилюминесцентных субстратов (Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс) в течение одной минуты перед считыванием планшетов на планшет-ридере SpectraMax в режиме люминесценции. Концентрацию аналита в образцах сыворотки крови рассчитывали с помощью стандартной кривой, построенной с помощью алгоритма аппроксимации линейной кривой Log-Log из аналитической программы Softmax (Molecular Devices).

Таблица 13. Фармакокинетические параметры указанных молекул у Balb/C мышей

	Доза	Путь	CL	Vss	AUC (0- послед- ний моме- нт време- ни)	C _{max}	T _{max}	T _{1/2}	Биодост- упность
	мг/кг		мл/ч/кг	мл/кг	нМ*ч	нМ	ч	ч	%
IL2(21-153)- (G3S)3-CD25(22- 240)	0,5	IV	1,3	46,3	8046,3	NA	NA	19,4	NA
	0,5	SC	NA	NA	3639,6	79	24	31	45%
IL2(21-153)- (G3S)3-CD25(22- 212)	0,5	IV	4	94,2	3053,1	NA	NA	19,4	NA
	0,5	SC	NA	NA	2033,1	54,6	7	23	67%
IL2(21-153)- (G3S)3-CD25(22- 187)	0,5	IV	23,1	200,4	610,4	NA	NA	11,6	NA
	0,5	SC	NA	NA	261,3	13,2	7	10,9	43%

	Доза	Путь	CL	Vss	AUC (0- послед- ний моме- нт време- ни)	C _{max}	T _{max}	T _{1/2}	Биодост- упность
	мг/кг		мл/ч/кг	мл/кг	нМ*ч	нМ	ч	ч	%
Fc1. 1- GSGGSGG- IL2(21-153)- (G3S)3-CD25(22- 212)	0,5	IV	1,96	167,6	1442	NA	NA	66,6	NA
	0,5	SC	NA	NA	886,5	12,02	24	68,8	61%
IL2(21-153)- (G3S)3-CD25(22- 212)-Fc1. 1	0,5	IV	1,2	194,4	1771,3	NA	NA	120	NA
	0,5	SC	NA	NA	1478,6	16,2	24	61,3	83%

NA = не применимо, ND = не определено.

Таблица 14. Фармакокинетические параметры hIL2-CD25(22-212) у яванских макак

	Доза	Путь	AUC (0- последний момент времени)	C _{max}	T _{max}	T _{1/2}
	мг/кг		нМ*ч	нМ	ч	сутки
IL2(21-153)- (G3S)3-CD25(22- 212)	0,075	SC	1200	7,6	24	2,1

Пример 5

Активность слитого белка IL2-CD25 на клетках Kit225

[00470] Биологическая активность модифицированных слитых белков определяли путем измерения способности стимулировать IL2R, который эндогенно экспрессируется на линии Т-клеток Kit225 (IL2-зависимая линия Т-клеток человека от пациента с Т-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом с ОКТ3+, -Т4+, -Т8-фенотип). Активность измеряли с применением репортерной системы, чувствительной к сигнальному каскаду IL2R. Человеческие Т-клетки Kit225 со стабильно интегрированным репортерным геном люциферазы светлячка под контролем IFN γ -активирующей последовательности (IRF1-GAS-Luc) выращивали в среде, содержащей RPMI + глутамакс, 10% термоинактивированного FBS, 20 нг/мл рекомбинантного IL2 (Invitrogen PHC0023), 1% смеси пеницилина/стрептавидина (Pen/Strep) и 0,7 мг/мл генетицина. За сутки до анализа репортерные клетки промывали и ресуспендировали в аналитической среде (RPMI без фенолового красного + L-глутамина, 10% термоинактивированный FBS, 1% Pen/Strep) для удаления IL2, присутствующего в ростовой среде, затем инкубировали в течение ночи при температуре 37°C. В день проведения анализа молекулы IL2 серийно разводили в аналитическом буфере для получения 3-кратной 11-точечной кривой зависимости от концентрации, в аналитический планшет CulturPlate-384 (Perkin Elmer, кат. № 6007688) вносили молекулы IL2 в различных концентрациях с последующим добавлением 70000 клеток/лунка. Аналитические планшеты инкубировали в течение 5 часов в CO $_2$ -термостате при 37°C, затем уравнивали до комнатной температуры в течение 20 минут перед добавлением субстрата ONE-GLO™ (Promega E6120). Планшеты герметизировали и измеряли люминесцентные сигналы на Perkin Elmer Envision. С помощью GraphPad Prism строили 11 точек люминесцентных сигналов зависимости дозы от ответа IL2. Определяли EC50 как концентрацию тестируемых слитых белков IL2, соответствующую 50% активации и полученную из 11-точечной аппроксимированной кривой, которая была построена с помощью четырехпараметрической модели логистической регрессии. Действенность слитых белков в отношении передачи сигналов от IL2R у первичных клеток определяли путем стимуляции слитыми белками либо мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека, либо цельной крови человека. Фосфорилирование тирозина pSTAT5 является непосредственным следствием передачи сигналов от IL2R, и с помощью проточной цитометрии оно было детектировано у различных популяций клеток цельной крови или PBMC. Образцы крови или

PBMC обрабатывали серийными разведениями слитых белков hIL2-CD25 в течение 15 минут при температуре 37°C. После инкубации клетки фиксировали и кровь лизировали буфером для лизиса/фиксации (Lyse/Fix) в течение 10 минут (BD Phosflow). Клетки дважды промывали, а затем пермеабелизировали ледяным метанолом на льду в течение 30 мин, дополнительно дважды промывали. Затем образцы обрабатывали блокатором Human Fc Block (Ebioscience) с последующим окрашиванием мечеными антителами к CD3, CD4, CD8, CD25, pSTAT5, Foxp3 и CD56. Затем все образцы анализировали методом проточной цитометрии.

[00471] В клеточных анализах *in vitro* слитый белок проявлял действенность в отношении активации рецептора IL2, которая была значительно смещена вправо (в сторону более низкой действенности) относительно IL2 дикого типа (wt). Это согласовывалось с пониженной кажущейся аффинностью слитого белка в нековалентной димерной форме. Добавление Fc-хвоста к слитому белку действительно приводило к дополнительному смещению в сторону в 20-30 раз более низкой действенности. Удаление His-метки или укорочение С-конца оказывало минимальное влияние на действенность слитых белков. Аналогичные результаты по относительной действенности были получены и для цельной крови.

Таблица 15А. Активность слитого белка IL2-CD25 на клетках Kit225

Слитый белок	EC ₅₀ (нг/мл)	
IL2 WT	0,41	N=9
hIL2-CD25 (22-240)-His	138	n=2
hIL2-C145V-CD25 (22-240)-His	166	n=2
hIL2-CD25(22-212)-His	210	n=2
hIL2-CD25(22-212)	139	n=12
hIL2-CD25(22-187)-His	145	n=2
hIL2-CD25(22-187)	49	n=2
c1.1-7linker-IL2-CD25(22-212) (двухвалентный)	3414	n=2
D25(22-212)-Fc1.1 (двухвалентный)	3413	n=2

Таблица 15В. Активность слитого белка IL2-CD25 на клетках Kit225

Белок	SEQ	Действенность			Ymax (%)
		EC50, нг/мл	STDEV	n	% ответа IL2 wt
wt-hIL2		0,42	0,23	9	N/A
hIL2-CD25(22-212)	16	139	112	12	103%
HSA-hIL2-CD25(22-187)	19	972	856	4	104%
hIL2-CD25(22-187)-HSA	20	205	78	4	95%
Fc-hIL2-CD25(22-187)	26	327	90	3	91%
hIL2-CD25(22-187)-Fc	27	257	95	3	93%
Fc-(hIL2-CD25(22-187)) ₂ , двухвалентный	67	737	264	4	97%
hIL2-CD25 (агликозилированный по четырем остаткам)	202	39,4	3,1	3	85%

[00472] Избирательность белков hIL2-CD25, в том числе передачу сигналов с участием hIL2-CD25(22-212) (SEQ ID NO:16) на Treg, по сравнению с другими типами клеток, можно измерять путем отслеживания фосфорилирования STAT5 через 15 минут в смешанной популяции клеток, включая PBMC или цельную кровь (фиг. 9А и 9В соответственно). Свежеполученные образцы крови обрабатывали серийными разведениями hIL2-CD25(22-212) (SEQ ID NO:16) в течение 15 минут при температуре 37°C. После инкубации клетки обрабатывали (фиксировали и пермеабелизировали), окрашивали мечеными антителами к CD3, CD4, CD8, CD25, pSTAT5, Foxp3 и CD56 и анализировали методом проточной цитометрии. Treg очень чувствительны к стимуляции IL2R с помощью hIL2-CD25(22-212) (SEQ ID NO:16) с максимальной эффективностью в 90% Treg, которые отвечают на стимуляцию при активации pSTAT5, и с действенностью 7 +/- 11 нг/мл. В отличие от сильной

активации, наблюдаемой на Treg, CD4 отличные от Treg клетки (foxp3-), CD8 и NK-клетки менее эффективно стимулировались посредством hIL2-CD25(22-212) (SEQ ID NO:16); менее 50% этих клеток активировали выработку pSTAT5 даже при концентрациях до 2700 нг/мл в среднем для всех других типов клеток (таблица 16). В целом, избирательность IL2R в отношении Treg по сравнению с другими типами клеток сохранялась или увеличивалась в случае hIL2-CD25(22-212) (SEQ ID NO:16) по сравнению с rhIL2. Слитые белки Fc или HSA с IL2-CD25 сохраняли высокую избирательность в отношении Treg в цельной крови, хотя и с более низкой действенностью (таблица 16).

Таблица 16. Действенность и эффективность стимуляции различных типов клеток в цельной крови человека. Данные представлены в виде средних значений для 2-10 доноров по свежесобранной крови нормальных доноров. Максимальный % положительных по pSTAT5 клеток был определен при концентрациях, в ~200-400 раз превышающих действенность в отношении Treg

	Treg		CD4 foxp3- Отличные от Treg	CD8 Т-клетки	NK-клетки
% положительных по pSTAT5 клеток	EC50 нг/мл	Максимум при наиболее высокой протестированной концентрации	Максимум при наиболее высокой протестированной концентрации	Максимум при наиболее высокой протестированной концентрации	Максимум при наиболее высокой протестированной концентрации
hIL2-CD25(22-212) (SEQ 16)	7,2 ($\pm$ 10,4, n=10)	90% (+/-8, n=10)	48% (+/-14, n=10) при 2,7 мкг/мл	27% (+/-11, n=10) при 2,7 мкг/мл	22% (+/-19, n=8) при 2,7 мкг/мл
Fc-(IL2-CD25) ₂ (SEQ 67), двухвалентный	88 ($\pm$ 74, n=4)	95% (+/-2, n=4)	50% (n=3) в кол-ве 24 мкг/мл	33% (n=3) в кол-ве 24 мкг/мл	8% (n=2) в кол-ве 24 мкг/мл

Fc-(IL2-CD25) (SEQ 26), одновалентный	25 (± 12 , n=3)	94% (+/-1, n=3)	60% (n=3) в кол-ве 8,1 мкг/мл	36% (n=3) в кол-ве 8,1 мкг/мл	6% (n=3) в кол-ве 8,1 мкг/мл
HSA-(G4S)3- IL2-CD25-FT (SEQ 19)	83 (± 53 , n=3)	95% (+/-3, n=3)	59% (n=2) в кол-ве 24 мкг/мл	38% (n=2) в кол-ве 24 мкг/мл	6% (n=2) в кол-ве 24 мкг/мл
IL2-CD25 FT- GG-HSA (SEQ 20)	43 (± 35 , n=2)	92% (+/-5, n=2)	60% (n=2) в кол-ве 8,1 мкг/мл	39% (n=2) в кол-ве 8,1 мкг/мл	10% (n=2) в кол-ве 8,1 мкг/мл
(IL2-CD25)-Fc (SEQ 27), одновалентный	11,4 ($\pm 1,6$, n=2)	94% (+/-5, n=2)	67% n=2 в кол-ве 8,1 мкг/мл	49% n=2 в кол-ве 8,1 мкг/мл	25% n=2 в кол-ве 8,1 мкг/мл

Пример 6

Активность *in vivo* на увеличение количества лейкоцитов при обработке укороченными слитыми белками IL2-CD25

[00473] Способность слитых белков увеличивать количество лейкоцитов *in vivo* тестировали на мышах с гуманизированной иммунной системой. 16-20-недельных самок мышей с приживленными NSG-huCD34 (NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ, у которых воссозданы человеческие CD34+ гематopoэтические стволовые клетки) приобретали у компании Jackson Laboratory. Через 14 недель после приживления каждую гуманизированную мышь изучали на наличие hCD45+ клеток и мышинных CD45+ клеток (mCD45+) в периферической крови методом проточной цитометрии. Отбирали мышей по меньшей мере с 25% приживлением человеческого CD45. Пересаженные гематopoэтические стволовые клетки человека были протестированы на отсутствие ВИЧ, HBV, HCV и LCMV (вируса лимфоцитарного хориоменингита). Животным без ограничения давали стандартный корм для грызунов и очищенную воду и давали им акклиматизироваться в течение как минимум 1

недели перед использованием. Все процедуры с использованием животных были рассмотрены и одобрены Комитетом по содержанию и использованию животных BMS. Раз в трое суток мышам с пересаженным NSG-huCD34 в возрасте 16-20 недель вводили подкожную дозу либо PBS, либо слитого белка huIL2-CD25(22-187), huIL2-CD25(22-212) и HuIL2-CD25(22-240) в количестве 10 мкг/мышь в объеме 200 мкл подкожно, пока животные находились под анестезией. Всего было введено три подкожные дозы: на 0-е, 3-е и 6-е сутки. Через 24 часа после последней дозы все обработанные группы подвергали анестезии, собирали селезенку в HBSS для FACS-анализа Treg, CD8 T- или NK-клеток. У всех трех слитых белков наблюдали схожую способность увеличивать количество клеток селезенки.

Пример 7

Стабильность пептидного линкера (G3S) 3 в IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212) в сыворотке крови человека или мыши

[00474] Был разработан биоаналитический способ на основе жидкостной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрией (LC-MS/MS) для подтверждения результатов оценки стабильности линкера (G3S)3, полученных в исследованиях стабильности в сыворотке *in vitro* и РК исследовании *in vivo* на обезьянах. После захвата IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212) (т. е. SEQ ID NO:16) с помощью крысиного антитела к IL-2 соотношение площадей пиков двух характерных пептидов, т. е. DLISNINVIVLELK (из домена IL-из IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212)) и EPPPWENEATER (из домена CD25 из IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212)) использовали для оценки стабильности линкера между IL-2 и CD25. Расщепление линкера и полученный в результате циркулирующий в сыворотке расщепленный продукт будет приводить к систематическому увеличению соотношения площадей IL2/CD25 >1.

[00475] Для тестирования возможности расщепления линкера у IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212) *in vitro* 0,5 мкМ IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212) инкубировали в сыворотке крови человека (Bioreclamation, кат. № HMSRM-M; партия № BRH1332647) или сыворотке крови мыши (Bioreclamation, кат. № MSES RM-BALB-M; партия № MSE264349) в общем объеме 1,5 мл в течение периода, составлявшего до 72 часов, при температуре 3°C. Образцы (200 мкл сыворотки крови) собирали через 0, 4, 24, 48 и 72 часа и хранили при -80°C до анализа соотношения площадей пиков методом LC-MS/MS. Для выявления наличия циркулирующего в кровотоке продукта расщепления, полученного в результате расщепления линкера *in vivo* после однократной дозы IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212) у обезьяны, образцы

сыворотки крови, собранные через 5, 24, 48, 72, 96 и 168 часов после введения дозы, анализировали на соотношение площадей пиков методом LC-MS/MS.

[00476] Как показано на фиг. 10, соотношение площадей пиков характерных пептидов в доменах IL2 и CD25 из IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212) в течение 72 часов инкубации *in vitro* в сыворотке крови человека или мыши при температуре 37°C оставалось близким к единице, что свидетельствовало о незначительном расщеплении линкера у IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212) как в сыворотке крови человека, так и в сыворотке крови мыши.

[00477] Кроме того, как показано на фиг. 11, в образцах сыворотки крови, взятых у обезьяны после введения однократной подкожной дозы 0,075 мг/кг IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212), соотношение суррогатных пептидов IL2 и CD25 после иммунозахвата с помощью антитела к IL2 оставалось близким к единице. Эти данные свидетельствовали об отсутствии расщепления линкера в сыворотке крови обезьян, которым была введена доза IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212) (т. е. SEQ ID NO:16).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий:
 - (a) первый полипептид, содержащий полипептид интерлейкина-2 (IL2); и
 - (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен полипептида альфа-рецептора интерлейкина-2 (IL2R α);

причем (i) у внеклеточного домена полипептида IL2R α по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с внеклеточным доменом природного IL2R α (SEQ ID NO:7); и/или (ii) у полипептида IL2 по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с природным IL2 (SEQ ID NO:2); и

причем слитый белок обладает активностью IL2.

2. Слитый белок по п. 1, причем у внеклеточного домена полипептида IL2R α по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше, по меньшей мере на два сайта гликозилирования меньше, по меньшей мере на три сайта гликозилирования меньше, по меньшей мере на четыре сайта гликозилирования меньше, по меньшей мере на пять сайтов гликозилирования меньше, по меньшей мере на шесть сайтов гликозилирования меньше, по меньшей мере на семь сайтов гликозилирования меньше, по меньшей мере на восемь сайтов гликозилирования меньше или по меньшей мере на девять сайтов гликозилирования меньше по сравнению с внеклеточным доменом природного IL2R α (SEQ ID NO:7).

3. Слитый белок по п. 1 или п. 2, причем у полипептида IL2 по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше по сравнению с природным IL2 (SEQ ID NO:2).

4. Слитый белок по любому из пп. 1-3, причем первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную последовательности под SEQ ID NO:2.

5. Слитый белок по любому из пп. 1-4, причем второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере

приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную последовательности под SEQ ID NO:12.

6. Слитый белок по любому из пп. 1-5, причем внеклеточный домен полипептида IL2R α , у которого по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше, содержит мутацию, которая удаляет сайт гликозилирования.

7. Слитый белок по п. 6, причем мутация удаляет сайт О-гликозилирования и/или сайт N-гликозилирования.

8. Слитый белок по п. 7, причем мутация удаляет сайт О-гликозилирования.

9. Слитый белок по п. 7, причем мутация удаляет сайт N-гликозилирования.

10. Слитый белок по любому из пп. 6-9, причем мутация представляет собой делецию аминокислот 167-219, аминокислот 168-219, аминокислот 169-219, аминокислот 170-219, аминокислот 171-219, аминокислот 172-219, аминокислот 173-219, аминокислот 174-219, аминокислот 175-219, аминокислот 176-219, аминокислот 177-219, аминокислот 178-219, аминокислот 179-219, аминокислот 180-219, аминокислот 181-219, аминокислот 182-219, аминокислот 183-219, аминокислот 184-219, аминокислот 185-219, аминокислот 186-219, аминокислот 187-219, аминокислот 188-219, аминокислот 189-219, аминокислот 190-219, аминокислот 191-219 или аминокислот 192-219, соответствующих последовательности под SEQ ID NO:7.

11. Слитый белок по п. 10, причем второй полипептид представляет собой последовательность под SEQ ID NO:11.

12. Слитый белок по п. 10, причем второй полипептид представляет собой последовательность под SEQ ID NO:12.

13. Слитый белок по любому из пп. 6-9, причем мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты, которая гликозилирована, на аминокислоту, которая не гликозилирована.

14. Слитый белок по любому из пп. 6-9, причем мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты, которая обеспечивает возможность гликозилирования на соседней аминокислоте, на аминокислоту, которая не обеспечивает возможность гликозилирования на соседней аминокислоте.

15. Слитый белок по п. 13, причем одна или несколько замен приходится на аминокислоту N49, аминокислоту N68, аминокислоту T74, аминокислоту T85, аминокислоту T197, аминокислоту T203, аминокислоту T208 и аминокислоту T216 или любую их комбинацию, причем расположения аминокислот соответствуют последовательности под SEQ ID NO:7.

16. Слитый белок по п. 15, причем одна или несколько замен представляют собой замену с аспарагина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

17. Слитый белок по п. 15, причем одна или несколько замен представляют собой замену с треонина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

18. Слитый белок по любому из пп. 15-17, причем одна из замен приходится на аминокислоту N49.

19. Слитый белок по п. 18, причем N49 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

20. Слитый белок по любому из пп. 15-19, причем одна из замен приходится на аминокислоту N68.

21. Слитый белок по п. 20, причем N68 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, треонина, серина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

22. Слитый белок по любому из пп. 15-21, причем одна из замен приходится на аминокислоту T74.

23. Слитый белок по п. 22, причем T74 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина,

глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

24. Слитый белок по любому из пп. 15-23, причем одна из замен приходится на аминокислоту T85.

25. Слитый белок по п. 24, причем T85 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

26. Слитый белок по любому из пп. 15-25, причем одна из замен приходится на аминокислоту T197.

27. Слитый белок по п. 26, причем T197 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

28. Слитый белок по любому из пп. 15-27, причем одна из замен приходится на аминокислоту T203.

29. Слитый белок по п. 28, причем T203 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

30. Слитый белок по любому из пп. 15-29, причем одна из замен приходится на аминокислоту T208.

31. Слитый белок по п. 30, причем T208 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

32. Слитый белок по любому из пп. 15-31, причем одна из замен приходится на аминокислоту T216.

33. Слитый белок по п. 32, причем T216 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

34. Слитый белок по п. 14, причем одна или несколько замен приходятся на аминокислоту S50, аминокислоту S51, аминокислоту T69, аминокислоту T70, аминокислоту C192 или любую их комбинацию, причем расположения аминокислот соответствуют последовательности под SEQ ID NO:7.

35. Слитый белок по п. 34, причем одна из замен приходится на аминокислоту S50.

36. Слитый белок по п. 35, причем S50 мутирована в пролин.

37. Слитый белок по любому из пп. 34-36, причем одна из замен приходится на аминокислоту S51.

38. Слитый белок по п. 37, причем S51 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, триптофана, тирозина и валина.

39. Слитый белок по любому из пп. 34-38, причем одна из замен приходится на аминокислоту T69.

40. Слитый белок по п. 39, причем T69 мутирована в пролин.

41. Слитый белок по любому из пп. 34-40, причем одна из замен приходится на аминокислоту T70.

42. Слитый белок по п. 41, причем T70 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

43. Слитый белок по любому из пп. 34-42, причем одна из замен приходится на аминокислоту C192.

44. Слитый белок по п. 43, причем C192 мутирована в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

45. Слитый белок по любому из пп. 1-44, причем полипептид IL2, у которого по меньшей мере на один сайт гликозилирования меньше, содержит мутацию, которая удаляет сайт гликозилирования.

46. Слитый белок по п. 45, причем мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты, которая гликозилирована, на аминокислоту, которая не гликозилирована.

47. Слитый белок по п. 45, причем мутация представляет собой одну или несколько замен аминокислоты, которая обеспечивает возможность гликозилирования на соседней аминокислоте, на аминокислоту, которая не обеспечивает возможность гликозилирования на соседней аминокислоте.

48. Слитый белок по п. 46 или п. 47, причем одна или несколько замен представляют собой замену с аланина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

49. Слитый белок по п. 47 или п. 47, причем одна или несколько замен представляют собой замену с треонина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, триптофана, тирозина и валина.

50. Слитый белок по п. 46 или п. 47, причем одна или несколько замен представляют собой замену с цистеина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагин, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

51. Слитый белок по п. 50, причем одна или несколько замен представляют собой замену с цистеина на серин.

52. Слитый белок по п. 50, причем одна или несколько замен представляют собой замену с цистеина на аланин.

53. Слитый белок по п. 50, причем одна или несколько замен представляют собой замену с цистеина на валин.

54. Слитый белок по п. 46 или п. 47, причем одна или несколько замен приходится на аминокислоту T3 относительно соответствующей последовательности под SEQ ID NO:2.

55. Слитый белок по любому из пп. 47-54, причем одна из замен приходится на аминокислоту C125.

56. Слитый белок по п. 55, причем замена по аминокислоте C125 выбрана из группы, состоящей из C125S, C125A и C125V.
57. Слитый белок по п. 45, причем мутация представляет собой делецию.
58. Слитый белок по п. 57, причем делеция приходится на аминокислоту A1.
59. Слитый белок по любому из пп. 1-58, причем слитый белок дегликозилирован ферментативным или химическим путем.
60. Слитый белок по п. 59, причем слитый белок дегликозилирован с помощью щелочи, гидразинолиза, ПНГазы F, эндо- H, O-гликозидазы или любой их комбинации.
61. Слитый белок по любому из пп. 1-60, дополнительно содержащий линкер, слитый в рамке между первым полипептидом и вторым полипептидом.
62. Слитый белок по п. 61, причем линкер представляет собой глицин/сериновый линкер.
63. Слитый белок по п. 62, причем глицин/сериновый линкер содержит аминокислотную последовательность $(GS)_n$, $(GGS)_n$, $(GGGS)_n$, $(GGGS)_n$ или $(GGGS)_n$, где n представляет собой целое число 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.
64. Слитый белок по п. 62, причем глицин/сериновый линкер содержит аминокислотную последовательность $(GGGS)_3$.
65. Слитый белок по любому из пп. 1-64, причем слитый белок дополнительно содержит гетерологичный фрагмент, слитый с первым полипептидом и/или вторым полипептидом.
66. Слитый белок по п. 65, причем гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, увеличивающий период полужизни.
67. Слитый белок по п. 65 или п. 66, причем гетерологичный фрагмент содержит неполипептидный фрагмент.
68. Слитый белок по п. 65 или п. 66, причем гетерологичный фрагмент содержит полипептид.
69. Слитый белок по п. 65, причем гетерологичный фрагмент содержит альбумин, иммуноглобулиновый константный участок или его часть, связывающий иммуноглобулин полипептид, иммуноглобулин G (IgG), связывающий альбумин полипептид (ABP), фрагмент для ПАСилирования, фрагмент для ГЭКирирования, XTEN, фрагмент для ПЭГирирования, Fc-участок и любую их комбинацию.

70. Слитый белок по любому из пп. 1-69, причем слитый белок является более стабильным, чем полипептид, состоящий из последовательности под SEQ ID NO:2 или последовательности под SEQ ID NO:13.

71. Слитый белок по п. 70, причем слитый белок обладает одним или несколькими свойствами, выбранными из группы, состоящей из (i) повышенной термодинамической стабильности по сравнению с эталонным белком; (ii) повышенной ТМ по сравнению с эталонным белком; (iii) повышенной устойчивости к разрушению по сравнению с эталонным белком; (iv) повышенной устойчивости к модификациям по сравнению с эталонным белком; (v) повышенной стабильности *in vivo* по сравнению с эталонным белком; и (vi) любой их комбинации, причем эталонный белок содержит (i) первый полипептид, содержащий полипептид интерлейкина-2 (IL2); и (b) второй полипептид, содержащий внеклеточный домен из полипептида альфа-рецептора интерлейкина-2 (IL2R α); и имеет по меньшей мере на один сайт гликозилирования больше по сравнению с слитым белком.

72. Слитый белок по любому из пп. 1-71, который представляет собой мономер.

73. Слитый белок по любому из пп. 1-72, который представляет собой димер.

74. Слитый белок по п. 73, причем димер содержит два мономера, а мономеры связаны друг с другом ковалентными связями.

75. Слитый белок по п. 73, причем димер содержит два мономера, а мономеры связаны нековалентными связями.

76. Слитый белок по любому из пп. 1-75, который обладает одним или несколькими фармакокинетическими свойствами, выбранными из группы, состоящей из увеличенного периода полужизни, повышенной $C_{\max}$, увеличенной AUC, повышенной $C_{\min}$, пониженного клиренса, улучшенной биодоступности и любой их комбинации, по сравнению с фармакокинетическим свойством полипептида, состоящего из последовательности под SEQ ID NO:2 или последовательности под SEQ ID NO:13.

77. Слитый белок по п. 76, который обладает удлинённым периодом полужизни.

78. Слитый белок по п. 77, причем удлинённый период полужизни по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 6 раз, по меньшей мере приблизительно в 7 раз, по меньшей мере приблизительно в 8 раз, по меньшей мере приблизительно в 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по меньшей мере

приблизительно в 11 раз, по меньшей мере приблизительно в 12 раз, по меньшей мере приблизительно в 13 раз, по меньшей мере приблизительно в 14 раз, по меньшей мере приблизительно в 15 раз, по меньшей мере приблизительно в 16 раз, по меньшей мере приблизительно в 17 раз, по меньшей мере приблизительно в 18 раз, по меньшей мере приблизительно в 19 раз, по меньшей мере приблизительно в 20 раз, по меньшей мере приблизительно в 21 раз или по меньшей мере приблизительно в 22 раз больше по сравнению с периодом полужизни полипептида, состоящего из последовательности под SEQ ID NO:2 или последовательности под SEQ ID NO:13.

79. Композиция, содержащая слитый белок по п. 72 и слитый белок по п. 73.
80. Нуклеиновая кислота, которая кодирует слитый белок по любому из пп. 1-78.
81. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 80.
82. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 80.
83. Клетка-хозяин по п. 82, которая представляет собой эукариотическую клетку.
84. Клетка-хозяин по п. 82, причем клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки насекомого, дрожжевой клетки, трансгенной клетки млекопитающего и клетки растения.
85. Клетка-хозяин по п. 84, причем клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.
86. Клетка-хозяин по п. 82, которая представляет собой прокариотическую клетку.
87. Клетка-хозяин по п. 86, причем прокариотическая клетка представляет собой бактериальную клетку.
88. Фармацевтическая композиция, содержащая (а) слитый белок по любому из пп. 1-78, композицию по п. 79, нуклеиновую кислоту по п. 80, вектор по п. 81 или клетку-хозяина по любому из пп. 82-87; и (b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.
89. Набор, содержащий слитый белок по любому из пп. 1-78, композицию по п. 79, нуклеиновую кислоту по п. 80, вектор по п. 81 или клетку-хозяина по любому из пп. 82-87 и инструкции по введению слитого белка нуждающемуся в том субъекту.
90. Способ получения слитого белка по любому из пп. 1-78, предусматривающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп. 82-87 в подходящих условиях и выделение слитого белка.

91. Способ п. 90, причем клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку или прокариотическую клетку.

92. Способ по п. 90, причем клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, клетку насекомого, грибную клетку, клетку растения, трансгенную клетку млекопитающего или бактериальную клетку.

93. Способ по п. 90, причем клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из клетки СНО, клетки НЕК 293, клетки NS0, клетки Per С6, клетки ВНК и клетки COS.

94. Способ по п. 93, причем клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку.

95. Клетка-хозяин по п. 87 или способ по п. 94, причем бактериальная клетка представляет собой *Escherichia coli*.

96. Способ лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в том субъекта, предусматривающий введение субъекту эффективного количества слитого белка по любому из пп. 1-78, композиции по п. 79, нуклеиновой кислоты по п. 80, вектора по п. 81, клетки-хозяина по п. 82 или фармацевтической композиции по п. 88.

97. Способ по п. 96, причем заболевание или нарушение представляет собой рак.

98. Способ по п. 97, причем рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки, карциному эндометрия, рак яичников, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак головы и шеи, рак легких, рак желудка, герминогенный рак, рак костей, плоскоклеточный рак, рак кожи, новообразование центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, саркому, рак вирусного происхождения, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, ходжкинскую или неходжкинскую лимфому, рак поджелудочной железы, глиобластому, глиому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, миелому, карциному слюнной железы, рак почек, базальноклеточную карциному, меланому, рак предстательной железы, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, рак яичка, рак пищевода или рак головы и шеи и любые их комбинации,

99. Способ по п. 96, причем заболевание или нарушение представляет собой воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание.

100. Способ по п. 99, причем воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из сахарного диабета 1-го типа, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, глютеиновой болезни, системной красной волчанки,

волчаночного нефрита, кожной волчанки, ювенильного идиопатического артрита, болезни Крона, язвенного колита или склеродермии, болезни «трансплантат против хозяина», псориаза, очаговой алопеции, HCV-индуцированного васкулита, синдрома Шегрена, пузырьчатки, анкилозирующего спондилоартрита, болезни Бехчета, гранулематоза Вегенера, синдрома Такаясу, аутоиммунного гепатита, склерозирующего холангита, синдрома Гужеро-Шегрена и активации макрофагов.

101. Способ по п. 96, причем заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание.

102. Способ по п. 101, причем инфекционное заболевание обусловлено патогенным вирусом.

103. Способ по п. 102, причем патогенный вирус выбран из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита А, вируса гепатита В, вируса гепатита С, вируса герпеса, аденовируса, вируса гриппа, флавивирусов, эховируса, риновируса, коксаки-вируса, коронавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса эпидемического паротита, ротавируса, вируса кори, вируса краснухи, парвовируса, вируса коровьей оспы, Т-лимфотропного вируса человека (HTL), вируса денге, папилломавируса, вируса моллюска, полиовируса, вируса бешенства, вируса Джона Каннингема (JC вируса) и вируса арбовирусного энцефалита.

104. Способ по п. 101, причем инфекционное заболевание обусловлено патогенной бактерией.

105. Способ по п. 104, причем патогенная бактерия выбрана из группы, состоящей из хламидии, риккетсиозной бактерии, микобактерии, стафилококков, стрептококков, пневмококков, менингококков и гонококков, клебсиеллы, протей, серратии, псевдомон, легионеллы, дифтерии, сальмонеллы, бацилл, холеры, тетануса, ботулизма, сибирской язвы, чумы, лептоспироза и бактерии, вызывающей болезнь Лайма.

106. Способ по п. 101, причем инфекционное заболевание обусловлено патогенными грибами.

107. Способ по п. 106, причем патогенный грибок выбран из группы, состоящей из представителя рода *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т. д.), *Cryptococcus neoformans*, представителя рода *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т. д.), представителя рода *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

108. Способ по п. 101, причем инфекционное заболевание обусловлено патогенным паразитом.

109. Способ по п. 108, причем патогенный паразит выбран из группы, состоящей из *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba sp.*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium sp.*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* и *Nippostrongylus brasiliensis*.

110. Способ по любому из пп. 96-109, дополнительно предусматривающий введение субъекту второго средства.

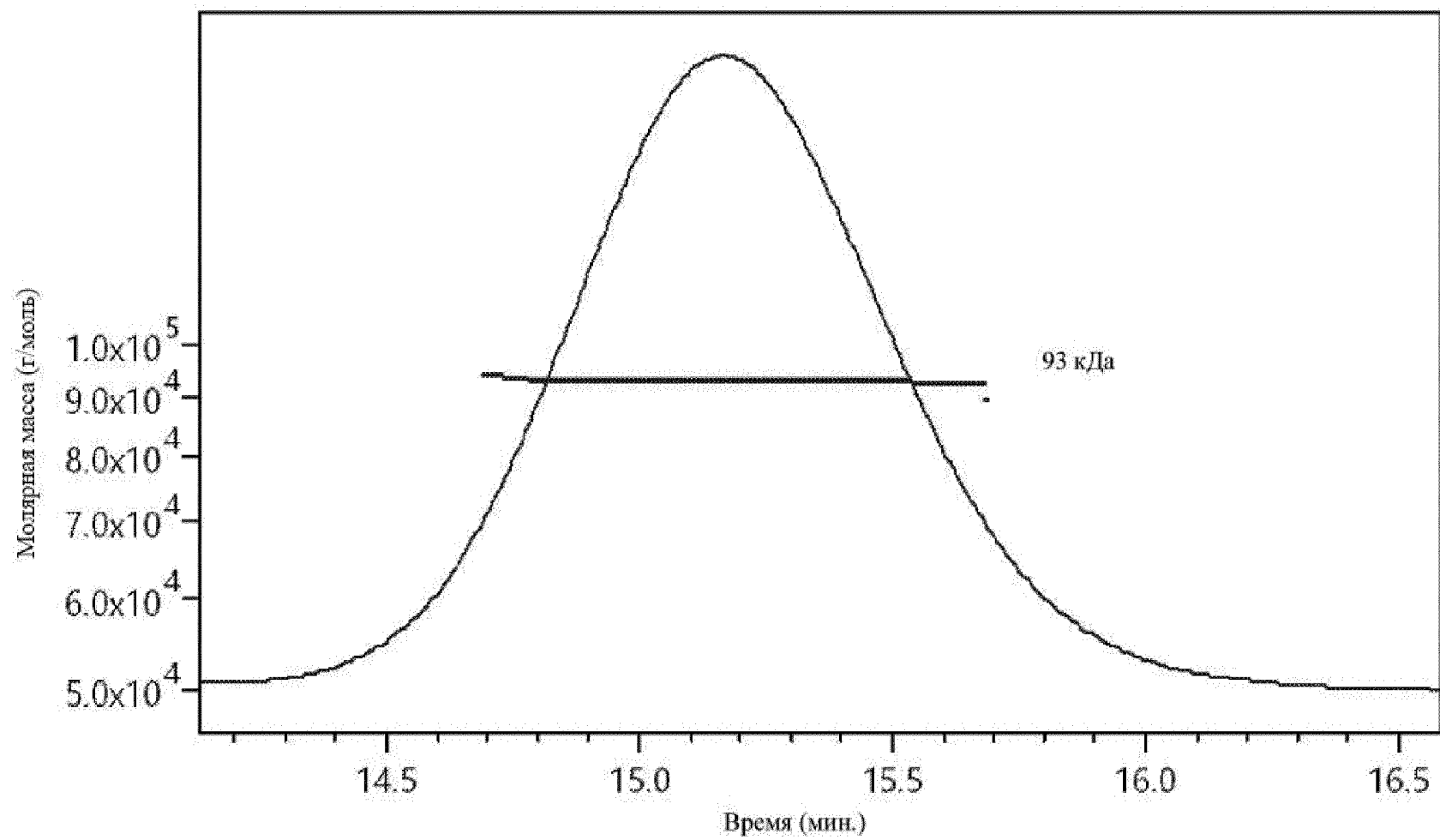
111. Способ по п. 110, причем второе средство представляет собой антагонист PD-1, антагонист CTLA-4, антагонист TIM3, антагонист GITR, антагонист KIR, антагонист LAG3 или любую их комбинацию.

112. Способ по п. 111, причем второе средство представляет собой антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к CTLA-4, антитело к TIM3, антитело к KIR, антитело к GITR, антитело к LAG3 или любую их комбинацию.

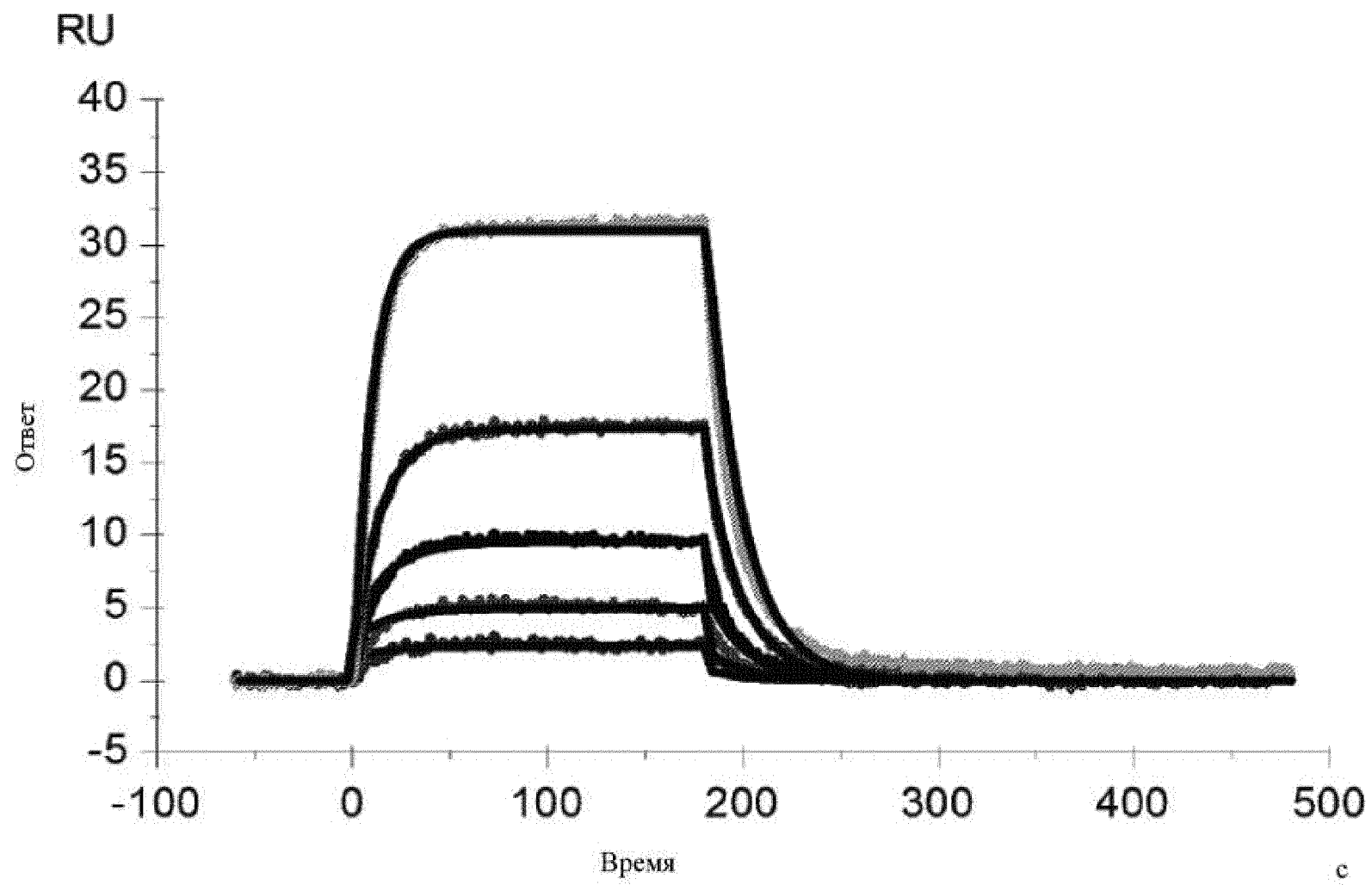
113. Способ по любому из пп. 110-112, причем второе средство представляет собой ингибитор цитокинов.

114. Способ по п. 113, причем ингибитор цитокинов нацелен на один или несколько из IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF, IFN- γ или любой их комбинации.

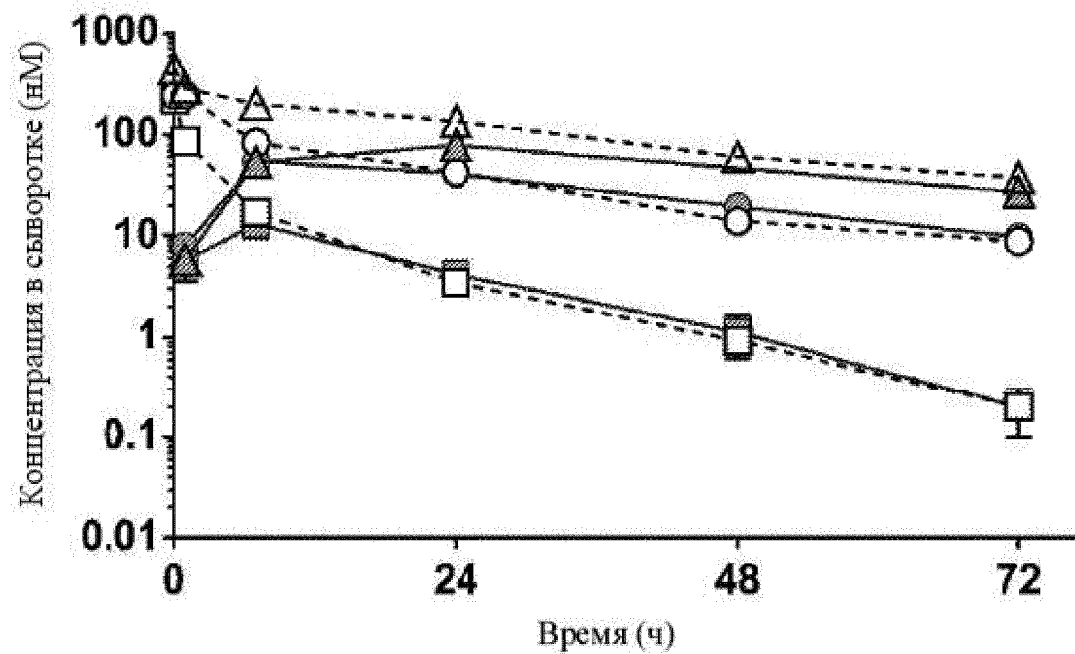
115. Способ по любому из пп. 96-114, причем слитый белок вводят местно, через слизистую эпидермиса, интраназальным, пероральным, вагинальным, ректальным, подъязычным, местным, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным, внутриартериальным, внутриоболочечным, внутрилимфатическим, внутриочаговым, внутрикапсульным, внутриглазничным, внутрисердечным, внутридермальным, транстрахеальным, подкожным, внутрикожным, внутрисуставным, подкапсулярным, субарахноидальным, интраспинальным, эпидуральным или надчревным путем.



Фиг. 1



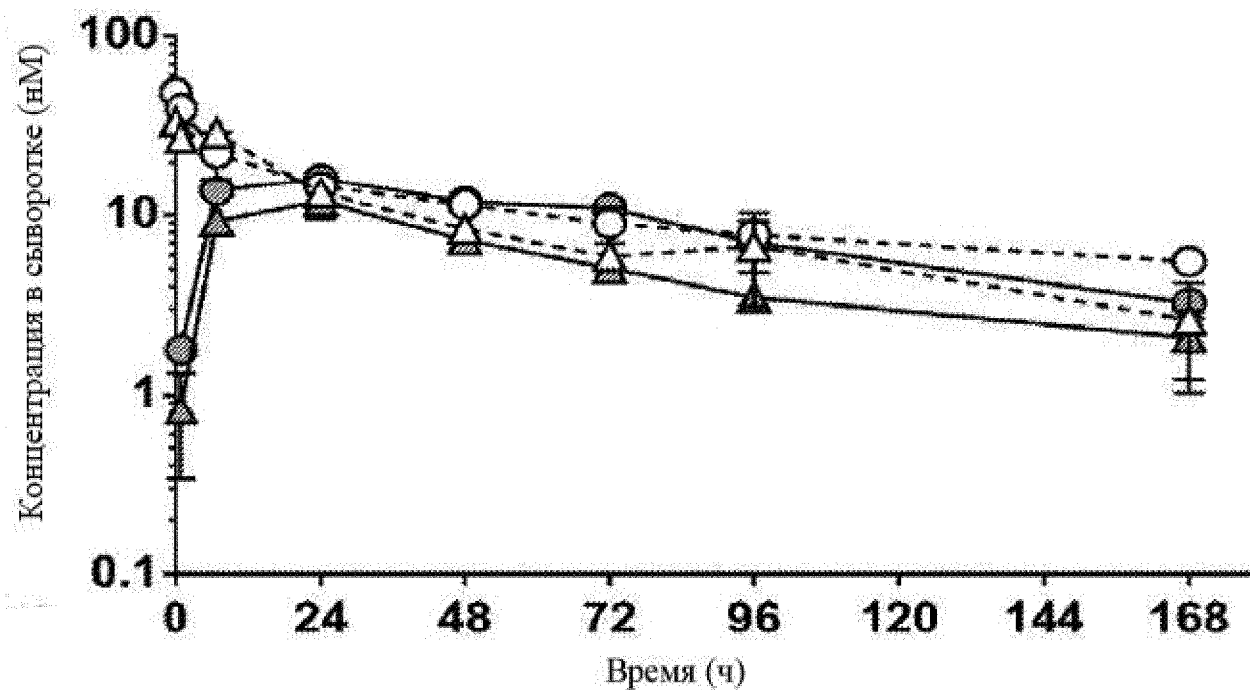
Фиг. 2



--△-- IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-240), IV
 --○-- IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212), IV
 --□-- IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-187), IV

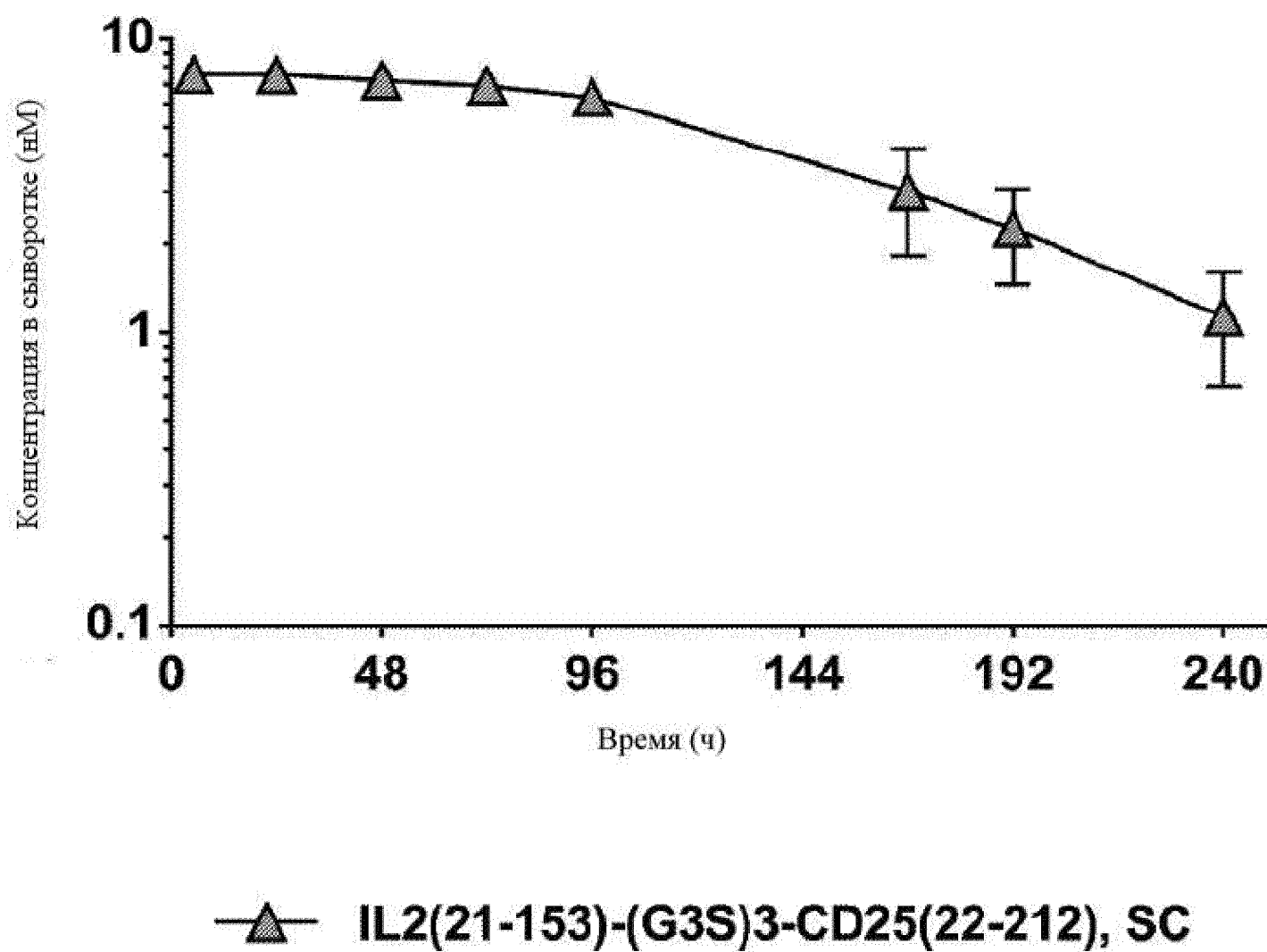
—△— IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-240), SC
 —●— IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212), SC
 —■— IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-187), SC

Фиг. 3

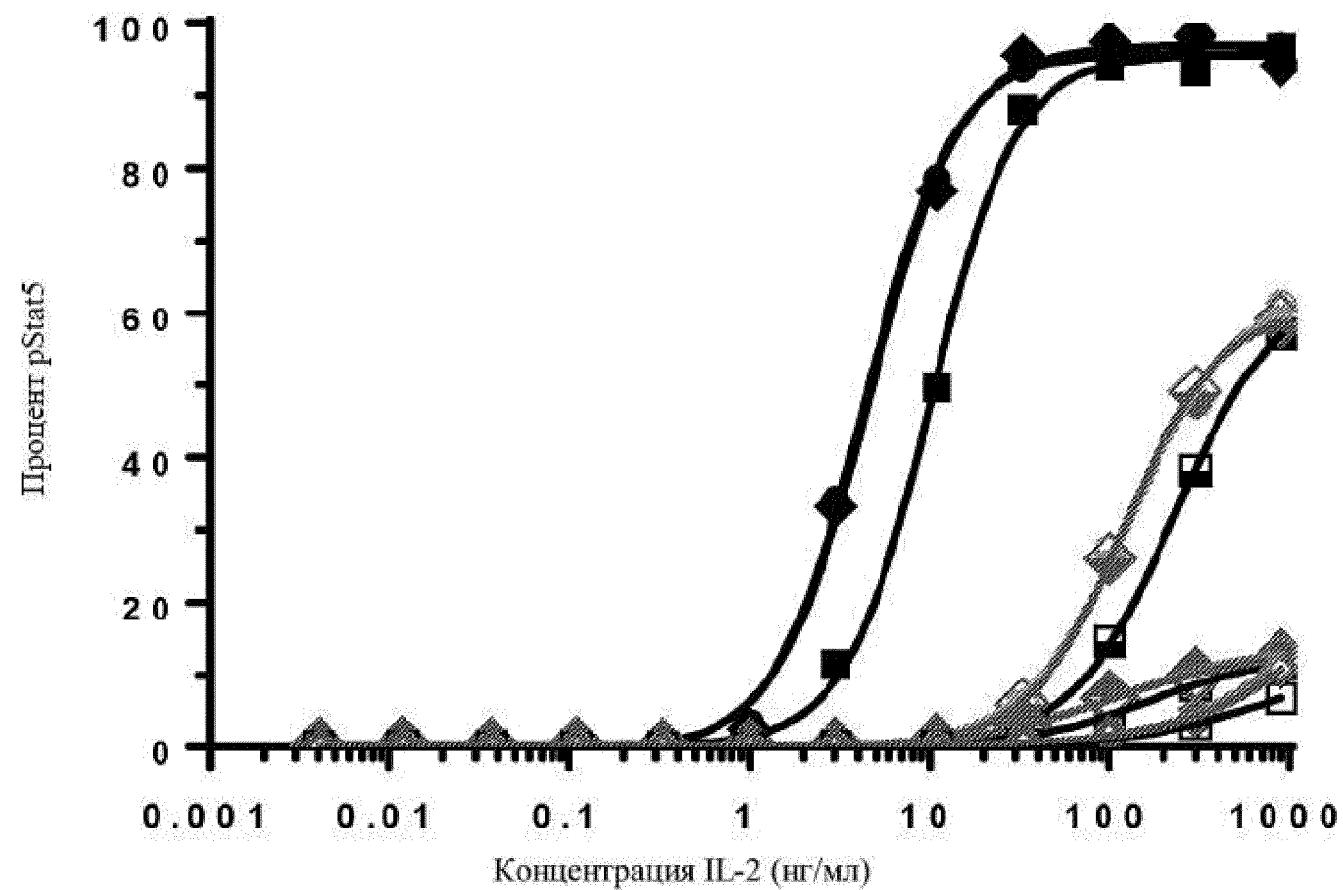


- △-- Fc1.1-GSGGSGG-IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212), IV
- IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212)-Fc1.1, IV
- △— Fc1.1-GSGGSGG-IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212), SC
- IL2(21-153)-(G3S)3-CD25(22-212)-Fc1.1, SC

Фиг. 4

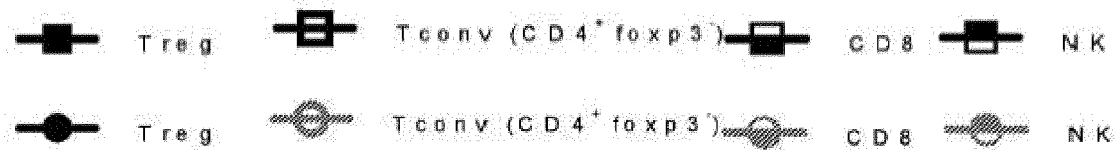
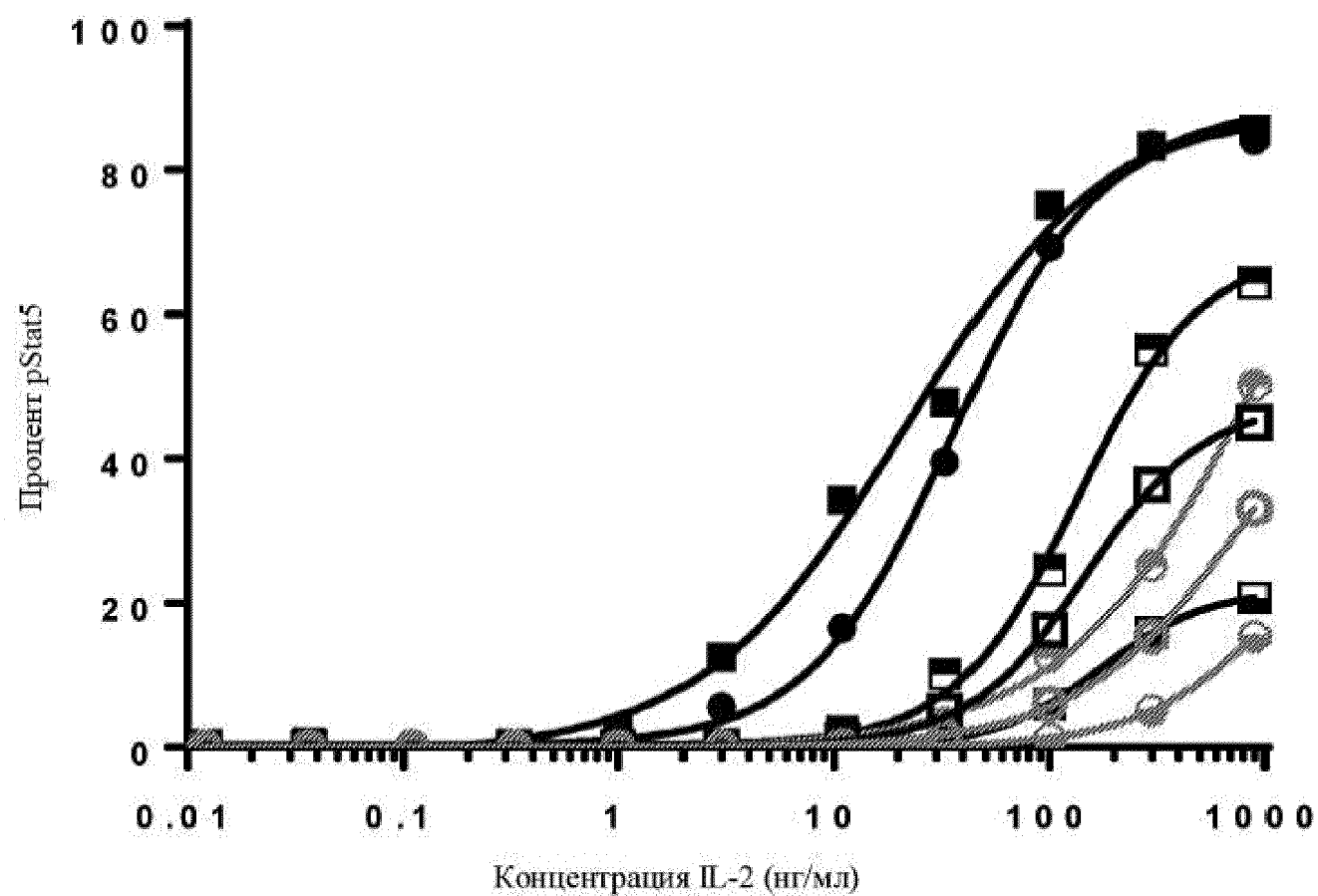


Фиг. 5

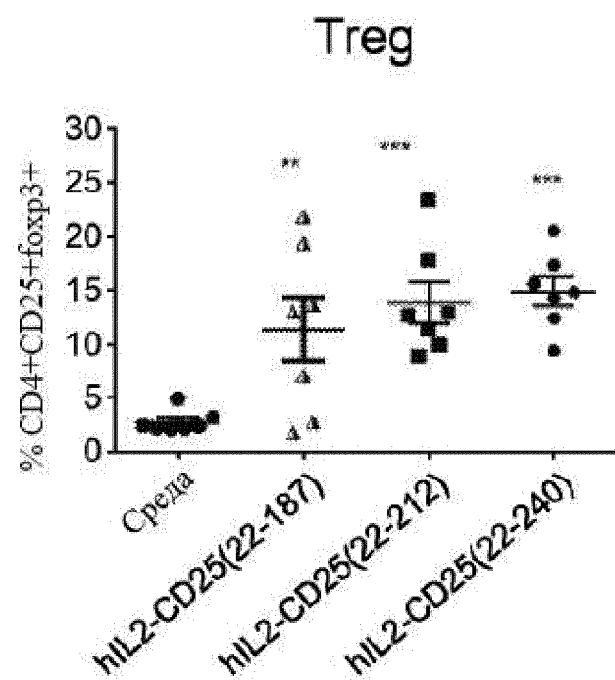


hIL2-CD25 (22-240)	■	% Treg	□	Tconv (CD4 ⁺ foxp3 ⁻)	■	CD8	□	NK-клетки
hIL2-CD25 (22-212)	●	% Treg	▨	Tconv (CD4 ⁺ foxp3 ⁻)	●	CD8	▨	NK-клетки
hIL2-CD25 (22-187)	◆	% Treg	◊	Tconv (CD4 ⁺ foxp3 ⁻)	◆	CD8	◊	NK-клетки

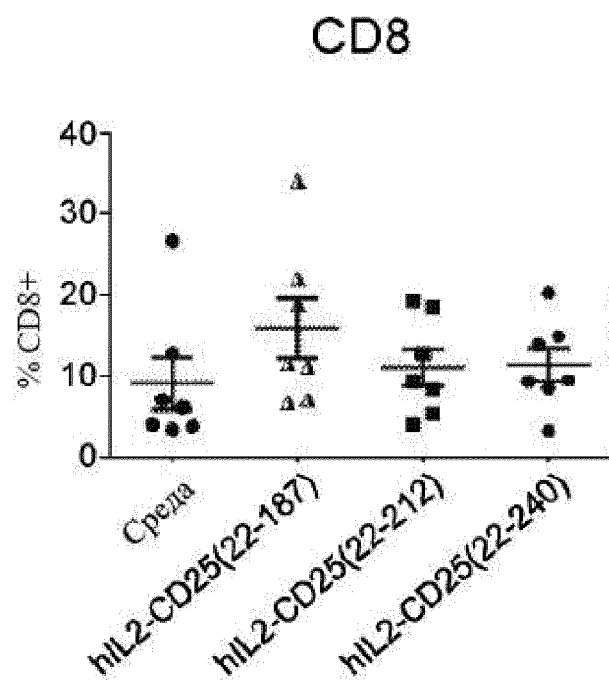
Фиг. 6



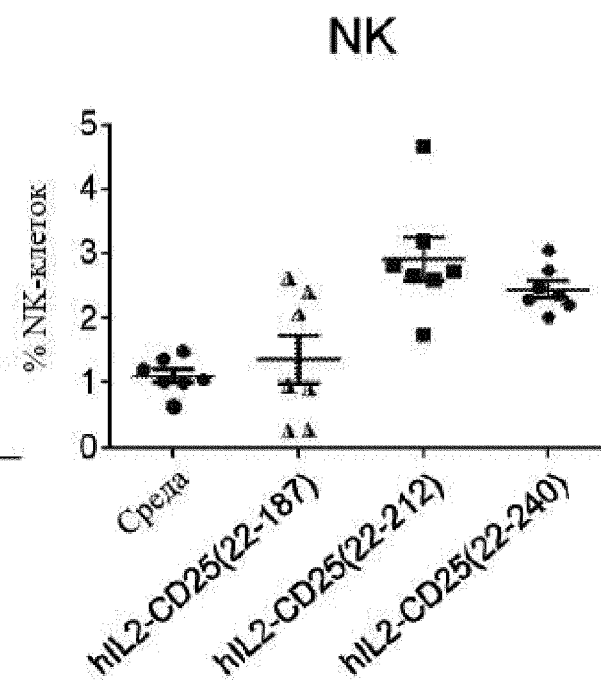
Фиг. 7



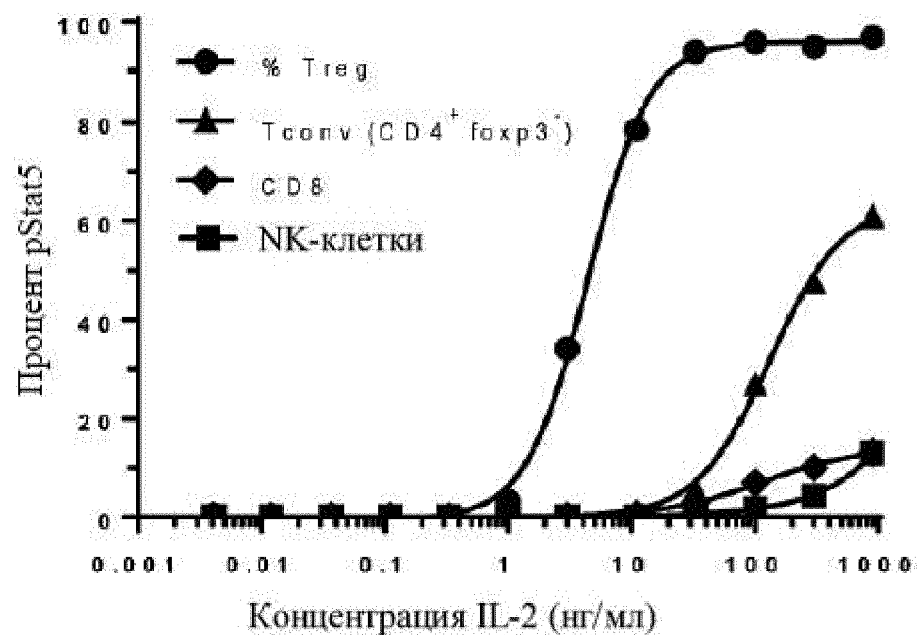
Фиг. 8А



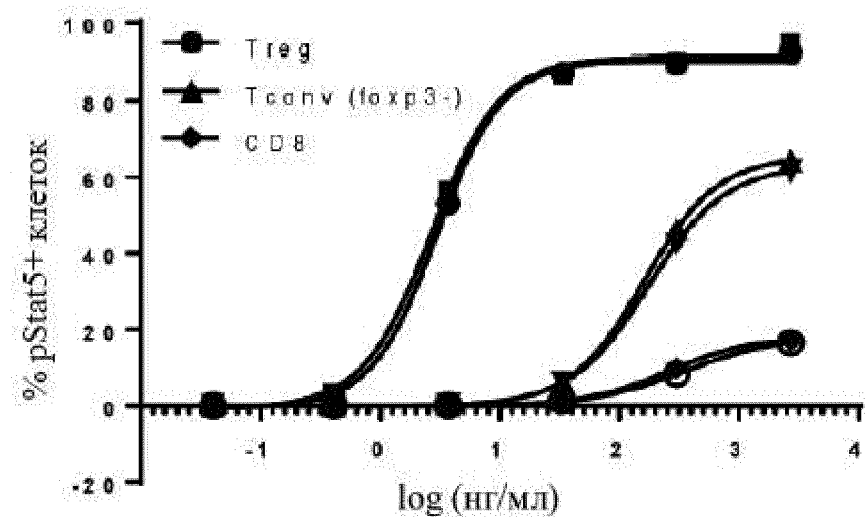
Фиг. 8В



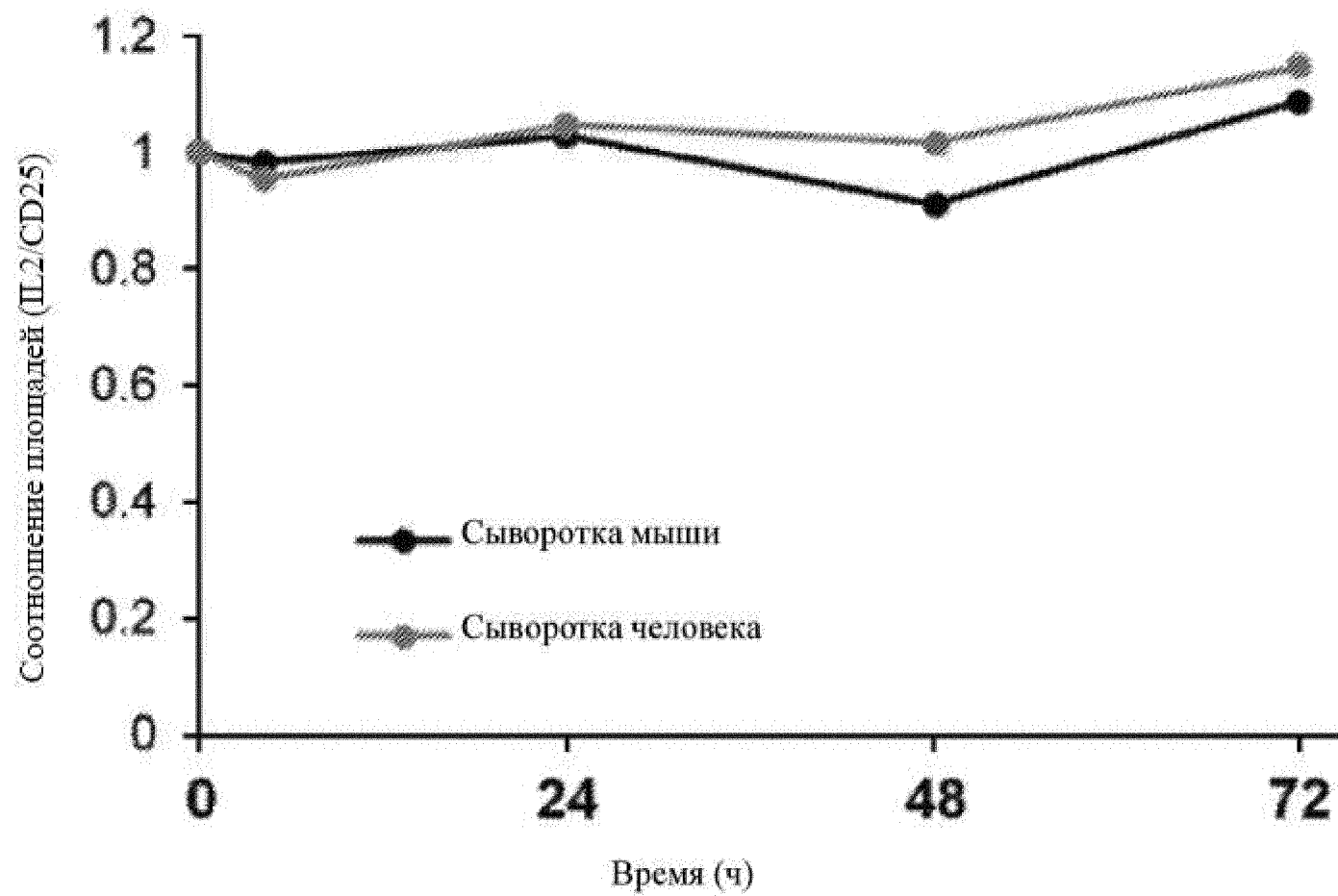
Фиг. 8С



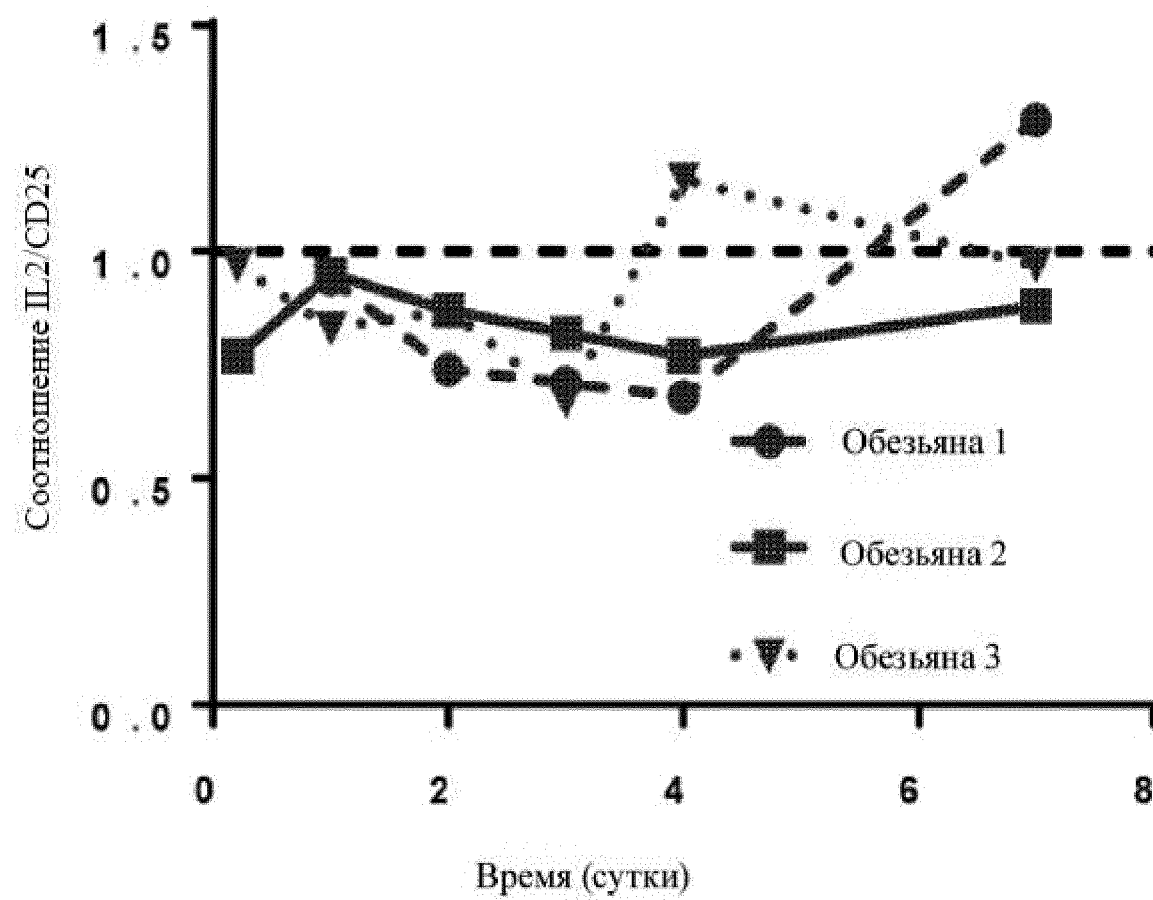
Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 10



Фиг. 11