

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202190593** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2021.11.18

(51) Int. Cl. *C07K 14/55* (2006.01)  
*A61K 38/20* (2006.01)  
*G01N 33/68* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.11.19

---

(54) **РАСЩЕПЛЕННЫЕ МИМЕТИКИ ИНТЕРЛЕЙКИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) 62/770,152

(32) 2018.11.20

(33) US

(86) PCT/US2019/062198

(87) WO 2020/106708 2020.05.28

(71) Заявитель:  
**ЮНИВЕРСИТИ ОФ ВАШИНГТОН**  
(US)

(72) Изобретатель:

**Кихано Рубио Альфредо, Сильва  
Манцано Даниэль Адриано, Бейкер  
Дэвид, Ульге Умут, Ладжойе Марк  
Джозеф (US)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

---

(57) Раскрыты условно активные агонисты рецептора, которые, при активации, связываются с гетеродимером  $\beta_c$  рецептора IL-2 (IL-2R $\beta_c$ ), гетеродимером  $\alpha_c$  рецептора IL-4 (IL-4R $\alpha_c$ ) или  $\alpha$ -субъединицей рецептора IL-13 (IL-13R $\alpha$ ), также раскрыты компоненты условно активных агонистов рецептора и способы применения условно активных агонистов рецептора.

**A1**

**202190593**

**202190593**

**A1**

# РАСЩЕПЛЕННЫЕ МИМЕТИКИ ИНТЕРЛЕЙКИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

## Перекрестная ссылка

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/770152, поданной 20 ноября 2018 г., полностью включенной в настоящую заявку посредством ссылки.

## Уровень техники

Значительный потенциал основных иммунных цитокинов интерлейкинов, таких как IL-2 и IL-4, для лечения рака послужил причиной многочисленных попыток улучшить их терапевтические свойства путем мутации и/или химической модификации. Однако, поскольку эти подходы тесно связаны с нативным IL-2 или IL-4, они не могут устранить нежелательные свойства, такие как низкая стабильность и связывание с  $\alpha$ -субъединицей рецептора IL-2 (IL-2R $\alpha$ ), с гетеродимером  $\alpha$ c рецептора IL-4 (IL-4R $\alpha$ c) или с  $\alpha$ -субъединицей рецептора IL-13 (IL-13R $\alpha$ ).

## Краткое описание изобретения

Согласно одному аспекту настоящего раскрытия предложены неприродные условно активные агонисты рецептора, содержащие первый полипептидный компонент и второй полипептидный компонент, причем указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный компонент не присутствуют в слитом белке, при этом в целом указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный компонент содержат домены X1, X2, X3 и X4, при этом:

а) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4);

(b) X2 представляет собой любой спиральный пептидный домен, содержащий по меньшей мере 8 аминокислот в длину;

(c) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (LE)DYAFNFELI(LEEIARLFESG) (SEQ ID NO:5); и

(d) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%,

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6).

при этом:

- 5 (i) аминокислотные остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать;
- (ii) указанный первый полипептидный компонент содержит по меньшей мере один из X1, X2, X3 и X4, но не содержит каждый из X1, X2, X3 и X4; и
- (iii) указанный второй полипептидный компонент содержит каждый из X1, X2, X3 и X4, который не присутствует в указанном первом полипептидном
- 10 компоненте;

при этом указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный компонент по отдельности не являются активными агонистами рецептора, и при этом указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептид взаимодействуют с образованием активного агониста гетеродимера  $\beta_c$  рецептора IL-2 (IL-2R $\beta_c$ ), гетеродимера  $\alpha_c$  рецептора IL-4 (IL-4R $\alpha_c$ ), IL-13 альфа или гетеродимера IL-4Rальфа/IL13Ральфа. В настоящей заявке предложены многочисленные варианты реализации первого и второго полипептидов. Согласно примерным вариантам реализации

15

- (i) первый полипептидный компонент содержит один из X1, X2, X3 и X4, и
- 20 второй полипептидный компонент содержит три из X1, X2, X3 и X4, которые не присутствуют в первом полипептидном компоненте; или

- (ii) первый полипептидный компонент содержит два из X1, X2, X3 и X4, и второй полипептидный компонент содержит два из X1, X2, X3 и X4, которые не присутствуют в первом полипептидном компоненте. Согласно другим примерным
- 25 вариантам реализации

- (i) первый полипептид содержит X1, и второй полипептид содержит X2, X3 и X4;
- (ii) первый полипептид содержит X2, и второй полипептид содержит X1, X3 и X4;
- 30 (iii) первый полипептид содержит X3, и второй полипептид содержит X1, X2 и X4;
- (iv) первый полипептид содержит X4, и второй полипептид содержит X1, X2 и X3;
- (v) первый полипептид содержит X1 и X2, и второй полипептид содержит X3 и
- 35 X4;

- (vi) первый полипептид содержит X1 и X3, и второй полипептид содержит X2 и X4;
- (vii) первый полипептид содержит X1 и X4, и второй полипептид содержит X2 и X3;
- 5 (viii) первый полипептид содержит X2 и X3, и второй полипептид содержит X1 и X4;
- (ix) первый полипептид содержит X2 и X4, и второй полипептид содержит X1 и X3;
- (x) первый полипептид содержит X3 и X4, и второй полипептид содержит X1 и  
10 X2;
- (xi) первый полипептид содержит X1, X2 и X3, и второй полипептид содержит X4;
- (xii) первый полипептид содержит X1, X2 и X4, и второй полипептид содержит X3;
- 15 (xiii) первый полипептид содержит X1, X3 и X4, и второй полипептид содержит X2; или
- (xiv) первый полипептид содержит X2, X3 и X4, и второй полипептид содержит X1.

Согласно другим примерным вариантам реализации первый полипептидный  
20 компонент и второй полипептидный компонент могут быть нековалентно ассоциированы, и/или первый полипептидный компонент и второй полипептидный компонент могут быть опосредовано связаны друг с другом рецептором. Согласно дополнительному примерному варианту реализации первый полипептидный компонент дополнительно содержит первый нацеливающий домен и/или второй полипептидный компонент дополнительно содержит  
25 второй нацеливающий домен; согласно некоторым вариантам реализации первый нацеливающий домен, когда он присутствует, представляет собой трансляционное слияние с первым полипептидом, и при этом второй нацеливающий домен, когда он присутствует, представляет собой трансляционное слияние со вторым полипептидом. Согласно некоторым вариантам реализации нацеливающие домены могут связываться с  
30 белком клеточной поверхности.

Согласно другому аспекту настоящего раскрытия предложены полипептиды, содержащие 1, 2 или 3, но не все 4 домена X1, X2, X3 и X4, причем:

- а) X1, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%,

40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI); (SEQ ID NO:4);

(b) X2, когда он присутствует, представляет собой любой спиральный пептидный домен;

5 (c) X3, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (LE)DYAFNFELLEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5); и

10 (d) X4, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6);

аминокислотные остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать.

Предложены многочисленные варианты реализации полипептидов. Согласно некоторым 15 примерным вариантам реализации полипептид содержит:

- (i) полипептид, содержащий X1 и не содержащий X2, X3 и X4;
- (ii) полипептид, содержащий X2 и не содержащий X1, X3 и X4;
- (iii) полипептид, содержащий X3 и не содержащий X1, X2 и X4;
- (iv) полипептид, содержащий X4 и не содержащий X1, X2 и X3;
- 20 (v) полипептид, содержащий X1 и X2 и не содержащий X3 и X4;
- (vi) полипептид, содержащий X1 и X3 и не содержащий X2 и X4;
- (vii) полипептид, содержащий X1 и X4 и не содержащий X2 и X3;
- (viii) полипептид, содержащий X2 и X3 и не содержащий X1 и X4;
- (ix) полипептид, содержащий X2 и X4 и не содержащий X1 и X3;
- 25 (x) полипептид, содержащий X3 и X4 и не содержащий X1 и X2;
- (xi) полипептид, содержащий X1, X2 и X3 и не содержащий X4;
- (xii) полипептид, содержащий X1, X2 и X4 и не содержащий X3;
- (xiii) полипептид, содержащий X1, X3 и X4 и не содержащий X2; и
- (xiv) полипептид, содержащий X2, X3 и X4 и не содержащий X1.

30 Согласно другому примерному варианту реализации полипептид дополнительно содержит нацеливающий домен, включая, но не ограничиваясь этим, нацеливающий домен, который представляет собой трансляционное слияние с полипептидом. Согласно некоторым вариантам реализации нацеливающие домены могут связываться с белком клеточной поверхности.

Согласно другим аспектам настоящего раскрытия предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, первый полипептид или второй полипептид согласно любому раскрытому варианту реализации; векторы экспрессии, содержащие нуклеиновые кислоты, функционально связанные с промотором; клетки-хозяева, содержащие

5 нуклеиновые кислоты и/или векторы экспрессии, раскрытые в настоящей заявке, и фармацевтическая композиция, содержащая условно активный агонист рецептора, полипептид, нуклеиновую кислоту, вектор экспрессии, или клетку-хозяина согласно любому из раскрытых вариантов реализации и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно настоящему раскрытию также предложены способы лечения рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, условно активного агониста рецептора согласно любому варианту реализации, раскрытому в настоящей заявке, в условиях, в которых первый полипептидный компонент и второй полипептидный компонент взаимодействуют на клетках опухоли для лечения рака.

10

Согласно другому аспекту настоящего раскрытия предложен условно активный агонист рецептора, полипептид, нуклеиновая кислота, вектор экспрессии, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция согласно любому раскрытому варианту реализации для применения в качестве лекарственного средства для лечения рака и/или для модуляции иммунного ответа у субъекта.

15

Согласно дополнительному аспекту настоящего раскрытия предложены способы агонистического действия на рецептор IL-2 или рецептор IL-4, включающие введение субъекту условно активного агониста рецептора согласно любому варианту реализации, раскрытому в настоящей заявке, в условиях, в которых первый полипептидный компонент и второй полипептидный компонент взаимодействуют на рецепторе.

20

## 25 **Описание графических материалов**

Следующие фигуры соответствуют иллюстративным вариантам реализации:

**Фигура 1A-1C. Вычислительное моделирование миметиков цитокинов *de novo*. ФИГ. 1A)** Сконструированные нерасщепленные миметики имеют четыре спирали; три имитируют взаимодействия IL-2 с hIL-2R $\beta$ , в то время как четвертая удерживает

30 первые три на месте. *Вверху*: в первом поколении моделей каждый из ядерных элементов IL-2 (спирали H1-H4) был независимо идеализирован с использованием сборки фрагментов из кластерной базы данных идеальных фрагментов (размер: 4 АК); *внизу*: во втором поколении моделей ядерные элементы вместо этого были построены с использованием параметрических уравнений, которые повторяют форму каждой

35 рассматриваемой по отдельности спирали, что позволяет изменять длину каждой спирали

на +/- 8 АК ; **ФИГ. 1В)** Пары спиралей были повторно соединены с использованием идеальных фрагментов петли (размер: 4 АК или 7 АК, для ген-1 и ген-2, соответственно, см. Методы), типичные примеры показаны с использованием новых построенных элементов, соединяющих каждую пару спиралей; **ФИГ. 1С)** Шпильки спиралей, созданные на **ФИГ. 1В**, были собраны во всех возможных комбинациях для создания полностью соединенных белковых остовов.

**Фигура 2. Определение характеристик неoleyкина-2/15.** Эксперименты по связыванию (интерферометрия биослоя) показывают, что неoleyкин-2/15 можно инкубировать в течение 2 часов при 80°C без какой-либо заметной потери связывания, в то время как человеческий и мышинный IL-2 быстро теряют активность.

**Фигура 3А-3С. Перестройка неoleyкина-2/15 в миметик человеческого интерлейкина-4 (hIL-4) (неoleyкин-4).** **ФИГ. 3А)** Neo-2/15 структурно выравнен со структурой IL-4 в комплексе с IL-4R $\alpha$  и  $\epsilon$  (из кода PDB 3VPL). Четырнадцать остатков IL-4, которые контактируют с IL-4R $\alpha$  и которые были привиты на Neo-2/15, отмечены. **ФИГ. 3В)** Неoleyкин-4 (Neo-4), новый белок с шестнадцатью аминокислотными мутациями по сравнению с Neo-2/15. Эти мутации отмечены; тринадцать из них были получены из остатков IL-4, изображенных на панели «а)», которые опосредуют контакт с IL-4R $\alpha$ , и три из них (H8M, K68I и I98F, подчеркнуты на фигуре) были введены путем направленной эволюции с использованием случайного мутагенеза и скрининга вариантов с высокой аффинностью связывания. **ФИГ. 3С)** Данные интерферометрии биослоя, показывающие, что Neo-4, как и IL-4, связывается с IL-4R $\alpha$  по отдельности, не обладает аффинностью в отношении  $\epsilon$  по отдельности, но связывается с  $\epsilon$ , когда в растворе присутствует IL-4R $\alpha$ .

**Фигура 4А-4Д. Общая консервативность последовательности в связывающих остатках для каждой из четырех общих спиралей, объединяющая информацию из трех различных миметиков IL-2, сконструированных de novo.** Логотипы последовательностей были созданы с использованием объединенных данных из экспериментов по связыванию (с использованием гетеродимерного мышинового IL-2R $\beta\gamma\epsilon$ ) из трех независимых библиотек SSM мутагенеза для G2\_neo2\_40\_1F\_seq27, G2\_neo2\_40\_1F\_seq29 и G2\_neo2\_40\_1F\_seq36 (**ФИГ. 11-13**). Все эти белки представляют собой функциональные высокоаффинные *de novo* миметики мышинового и человеческого IL-2, некоторые из которых имеют топологии, которые отличаются от таковой Neo-2/15, но все они содержат четыре спирали H1 (**ФИГ. 4А**; Neo-2/15 1-22 представляет собой SEQ ID NO:04, IL-2 6-27 представляет собой SEQ ID NO:248, IL-15 1-15 представляет собой SEQ ID NO:249), H3 (**ФИГ. 4В**; Neo-2/15 34-55 представляет собой SEQ ID NO:05, IL-2 82-103 представляет собой SEQ ID NO:250, IL-15 59-80 представляет собой SEQ ID

NO:251), H2' (**ФИГ. 4С**; Neo-2/15 58-76 представляет собой SEQ ID NO:07, IL-2 50-68 представляет собой SEQ ID NO:252, IL-15 34-52 представляет собой SEQ ID NO:253) и H4 (**ФИГ. 4D**; Neo-2/15 80-100 представляет собой SEQ ID NO:06, IL-2 111-131 представляет собой SEQ ID NO:254, IL-15 93-113 представляет собой SEQ ID NO:255) Логотипы демонстрируют объединенную информацию для каждой спирали независимо. Под каждым логотипом на линейной диаграмме показана оценка вероятности (более высокие значения означают большую консервативность) для каждой аминокислоты в последовательности Neo-2/15. Сплошная горизонтальная линия иллюстрирует положения, в которых аминокислота Neo-2/15 имеет оценку вероятности  $\geq 30\%$  (то есть эти аминокислоты вносят более общий вклад в связывание с рецептором, поскольку они характеризуются высокой представленностью повсеместно в связывающих популяциях на всех протестированных de novo миметиках IL-2). Топология каждой спирали в Neo-2/15 изображена слева от каждого логотипа. Последовательности спиралей Neo-2/15 и последовательности соответствующих спиралей (структурно выровненные) в человеческом IL-2 и IL-15 показаны под графиками, иллюстрируя индивидуальный характер спиралей Neo-2/15 и поверхностей связывания.

#### **Фигура 5А-5D. Экспериментальная оптимизация G1\_neo2\_40. ФИГ. 5А-5С)**

Тепловые карты для библиотеки односайтового мутагенеза G1\_neo2\_40, показывающие представленность в конкретных положениях после последовательных раундов повышающейся селекции с **ФИГ. 5А)** 50 нМ, **ФИГ. 5В)** 2 нМ и **ФИГ. 5С)** 0,1 нМ гетеродимера IL-2R $\beta$ <sub>c</sub>. На основе этих данных представленности была разработана комбинаторная библиотека с нуклеотидным разнообразием  $1,5 \times 10^6$ . **ФИГ. 5D)** Аминокислотные остатки, доступные в исходной комбинаторной библиотеке, изображены с указанием остатков, которые, как прогнозируется, являются предпочтительными (показаны над исходной последовательностью) и вредными (показаны под исходной последовательностью; на изображении исходной последовательности черным цветом обозначены остатки, которые представлены в комбинаторной библиотеке, и серым цветом обозначены остатки, не представленные в комбинаторной библиотеке).

#### **Фигура 6А-6Е. Экспериментальная оптимизация G2\_neo2\_40\_1F\_seq27.**

Тепловые карты для библиотеки односайтового мутагенеза G2\_neo2\_40\_1F\_seq27, показывающие представленность в конкретных положениях после последовательных раундов повышающейся селекции с **ФИГ. 6А)** 10 нМ, **ФИГ. 6В)** 1 нМ, **ФИГ. 6С)** 0,1 нМ и **ФИГ. 6D)** 0,1 нМ гетеродимера IL-2R $\beta$ <sub>c</sub>. На основе этих данных представленности была разработана комбинаторная библиотека с нуклеотидным разнообразием  $5,3 \times 10^6$ . **ФИГ. 6Е)** Аминокислотные остатки, доступные в исходной комбинаторной библиотеке,

изображены с указанием остатков, которые, как прогнозируется, являются предпочтительными; черным цветом обозначены остатки в исходной последовательности, представленные в комбинаторной библиотеке.

**Фигура 7А-7Е. Экспериментальная оптимизация G2\_neo2\_40\_1F\_seq29.**

- 5 Тепловые карты для библиотеки односайтового мутагенеза G2\_neo2\_40\_1F\_seq29, показывающие представленность в конкретных положениях после последовательных раундов повышающейся селекции с **ФИГ. 7А)** 10 нМ, **ФИГ. 7В)** 1 нМ, **ФИГ. 7С)** 0,1 нМ и **ФИГ. 7Д)** 0,1 нМ гетеродимера IL-2R $\beta$ <sub>c</sub>. На основе этих данных представленности была разработана комбинаторная библиотека с нуклеотидным разнообразием  $2,9 \times 10^6$ . **ФИГ.**
- 10 **7Е)** Аминокислотные остатки, доступные в исходной комбинаторной библиотеке, изображены с указанием остатков, которые, как прогнозируется, являются предпочтительными; черным цветом обозначены остатки в исходной последовательности, представленные в комбинаторной библиотеке.

**Фигура 8А-8Е. Экспериментальная оптимизация G2\_neo2\_40\_1F\_seq36.**

- 15 Тепловые карты для библиотеки односайтового мутагенеза G2\_neo2\_40\_1F\_seq36, показывающие представленность в конкретных положениях после последовательных раундов повышающейся селекции с **ФИГ. 8А)** 10 нМ, **ФИГ. 8В)** 1 нМ, **ФИГ. 8С)** 0,1 нМ и **ФИГ. 8Д)** 0,1 нМ гетеродимера IL-2R $\beta$ <sub>c</sub>. На основе этих данных представленности была разработана комбинаторная библиотека с нуклеотидным разнообразием  $2,7 \times 10^6$ . **ФИГ.**
- 20 **8Е)** Аминокислотные остатки, доступные в исходной комбинаторной библиотеке, изображены с указанием остатков, которые, как прогнозируется, являются предпочтительными; черным цветом обозначены остатки в исходной последовательности, представленные в комбинаторной библиотеке.

- Фигура 9А-9В. Исследование термической денатурации с помощью метода**
- 25 **кругового дихроизма (КД) для нескольких сконструированных *de novo* миметиков IL-2/IL-15, поколение-1. ФИГ. 9А)** Кривые термической денатурации и **ФИГ. 9В)** сканирования по длине волны.

- Фигура 10А-10В. Исследование термической денатурации с помощью метода**
- 30 **кругового дихроизма (КД) для нескольких сконструированных *de novo* миметиков IL-2/IL-15, поколение-1, экспериментально оптимизированных. ФИГ. 10А)** Кривые термической денатурации и **ФИГ. 10В)** сканирования по длине волны.

**Фигура 11А-11Д. Термограммы на основе спектра кругового дихроизма для**

моделей миметиков IL-2/IL-15 поколения-2. **ФИГ. 11А и ФИГ. 11С)** Кривые термической денатурации и **ФИГ. 11В и ФИГ. 11Д)** сканирования по длине волны.

**Фигура 12А-12С. Экспрессия, очистка и характеристика термической денатурации неoleyкина-2/15. ФИГ. 12А)** Гель-электрофорез в трис-трициновом буфере с ДСН, показывающий экспрессию и очистку на аффинной колонке. **ФИГ. 12В)** Круговой дихроизм при 222 нм во время термического плавления от 25°C до 95°C, показывающий надежную температурную стабильность. **ФИГ. 12С)** Сканирования по длине волны методом кругового дихроизма при 25°C, 95°C и затем снова при 25°C, показывающее, что неoleyкин-2/15 не плавится полностью при 95°C и полностью повторно складывается после охлаждения до 25°C.

**Фигура 13А-13В. Устойчивость неoleyкина-2/15 к одиночным цистеиновым мутантам в положениях, не относящихся к поверхности связывания. ФИГ. 13А)** Схема, показывающая положения точечных мутаций в неoleyкине-2/15, которые могут быть индивидуально мутированы в цистеин без нарушения экспрессии белка или связывания с IL-2Rβγс. Положения были выбраны так, чтобы избежать нарушения связывания с рецептором. **ФИГ. 13В)** Кинетика ассоциации мутантов по цистеину неoleyкина-2/15 с IL-2Rβγс, измеренная с использованием интерферометрии биослоя. Все варианты ассоциируются с рецептором примерно так же, как и Neo-2/15.

**Фигура 14А-14С. Экспрессия, очистка и характеристика термической денатурации неoleyкина-4. ФИГ. 14А)** Гель-электрофорез в трис-трициновом буфере с ДСН, показывающий экспрессию и очистку на аффинной колонке. **ФИГ. 14В)** Круговой дихроизм при 222 нм во время термического плавления от 25°C до 95°C, показывающий надежную температурную стабильность. **ФИГ. 14С)** Сканирования по длине волны методом кругового дихроизма при 25°C, 95°C и затем снова при 25°C, показывающее, что неoleyкин-4 не плавится полностью при 95°C и полностью повторно складывается после охлаждения до 25°C.

**Фигура 15А-С. Варианты расщепленного Neo-2/15 могут восстанавливать активность неoleyкина-2/15 путем связывания с человеческим рецептором IL-2. а.** Анализ методом интерферометрии биослоя связывания Neo-2/15, расщепленного между спиральями Н1 + Н3-Н2'-Н4 (Neo2A1 и Neo2B1, соответственно), с человеческим рецептором IL-2. Данные по связыванию собирали в Octet RED96 (ForteBio) и обрабатывали с использованием программного обеспечения для анализа данных ForteBio™, версия 9.0.0.10. Биотинилированный человеческий целевой рецептор с был иммобилизован на покрытых стрептавидином биосенсорах (SA ForteBio) при 1 мкг/мл в связывающем буфере (10 мМ HEPES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% сурфактанта Р20, 0,5% обезжиренного сухого молока) в течение 300 секунд. После загрузки целевого рецептора с на биосенсор выполняли измерение начального уровня,

погружая биосенсоры только в связывающий буфер, после этого кинетики связывания контролировали, погружая биосенсоры в лунки, содержащие целевой анализируемый белок (этап ассоциации), а затем погружая сенсоры обратно в начальные условия/буфер (диссоциация). Для этапа ассоциации анализируемые белки (то есть неолейкин-2/15, Neo2A1, Neo2B1 и эквимольное соотношение Neo2A1 + Neo2B1) разбавляли из концентрированных исходных растворов в связывающем буфере до конечной концентрации 100 нМ. В раствор также добавляли человеческий IL-2R $\beta$  в насыщающей концентрации (250 нМ). **б.** Анализ связывания методом интерферометрии биослоя Neo-2/15, расщепленного на спирали Н1-Н3 + Н2'-Н4 (Neo2A2 и Neo2B2, соответственно), следуя вышеупомянутому экспериментальному протоколу. **с.** Анализ связывания методом интерферометрии биослоя Neo-2/15, расщепленного на спирали Н1-Н3-Н2'+ Н4 (Neo2A3 и Neo2B3, соответственно), следуя вышеупомянутому экспериментальному протоколу.

**Фигура 16А-С. Варианты расщепленного Neo-2/15 стимулируют передачу клеточных сигналов за счет фосфорилирования STAT5 в мышинных линиях клеток CTLL-2.** **а.** Клетки CTLL-2 истощали в средах без цитокинов (RPMI, 10% ФБС, + 1 мМ пирувата натрия, + 2 мМ L-глутамин, 1% P/S) в течение 2 часов перед анализом. Клетки высевали в 96-луночный планшет и повторно суспендировали в среде RPMI, содержащей последовательные разведения образцов белка: неолейкин-2/15, Neo2A1, Neo2B1 и Neo2A1 + Neo2B1 в эквимольных соотношениях. Клетки стимулировали в течение 15 минут при 37°C и немедленно фиксировали путем добавления формальдегида до содержания 1,5% и 10-минутной инкубации при комнатной температуре. Клетки пермеабилizировали путем повторного суспендирования в холодном 100% метаноле в течение 30 мин при 4°C. Фиксированные и пермеабилizированные клетки дважды промывали буфером для FACS (ФСБ pH 7,2, содержащий 0,1% бычьего сывороточного альбумина) и инкубировали с антителом к STAT5 pY694, конъюгированным с Alexa<sup>TM</sup> Fluor 647 (BD Biosciences), разведенным 1:50 в буфере для FACS, в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем клетки дважды промывали буфером для FACS и определяли среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) на проточном цитометре Guava easyCyte<sup>TM</sup> (Millipore). Кривые зависимости ответа от дозы аппроксимировали к логистической модели и рассчитывали полумаксимальную эффективную концентрацию (значения ЭК<sub>50</sub>) с использованием программного обеспечения для анализа данных GraphPad Prism после вычитания СИФ нестимулированных клеток и нормирования к максимальной интенсивности сигнала. **б.** Анализ связывания методом интерферометрии биослоя Neo-2/15, расщепленного на спирали Н1-Н3 + Н2'-Н4 (Neo2A3 и Neo2B3, соответственно), следуя вышеупомянутому экспериментальному протоколу. **с.** Анализ связывания методом

интерферометрии биослоя Neo-2/15, расщепленного на спирали H1-H3-H2'+ H4 (Neo2A2 и Neo2B2, соответственно), следуя вышеупомянутому экспериментальному протоколу.

**Фигура 17А-В. Слияния вариантов расщепленного Neo2/15 с нацеливающими доменами связываются с рецептором IL-2.** **а.** Варианты расщепленного белка Neo2A и Neo2B, слитые с нацеливающими доменами DARPin против EGFR и против Her2. **б.** Анализ связывания методом интерферометрии биослоя слитых белков расщепленного Neo-2/15 с мышинным рецептором IL-2. Данные по связыванию собирали в Octet RED96 (ForteBio) и обрабатывали с использованием программного обеспечения для анализа данных ForteBio™, версия 9.0.0.10. Биотинилированный человеческий целевой рецептор c

10 был иммобилизован на покрытых стрептавидином биосенсорах (SA ForteBio) при 1 мкг/мл в связывающем буфере (10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% сурфактанта P20, 0,5% обезжиренного сухого молока) в течение 300 секунд. После загрузки целевого рецептора на биосенсор выполняли измерение начального уровня, погружая биосенсоры только в связывающий буфер, после этого контролировали

15 кинетики связывания, погружая биосенсоры в лунки, содержащие целевой белок (этап ассоциации), а затем погружая сенсоры обратно в начальные условия/буфер (диссоциация). Для этапа ассоциации анализируемые белки (то есть aHer2Neo2A1 + Neo2B1-aEGFR, aHer2Neo2A2 + Neo2B2-aEGFR, aHer2Neo2A3 + Neo2B3-aEGFR) разбавляли в эквимолярных количествах из концентрированных исходных растворов в

20 связывающем буфере до конечной концентрации 100 нМ. В раствор также добавляли мышинный IL-2Rβ в насыщающей концентрации (250 нМ).

**Нацеленное восстановление расщепленного неолейкина-2/15 на поверхности клеток K562, экспрессирующих Her2 и EGFR.** **а.** Варианты расщепленного белка Neo2A и Neo2B, слитые с нацеливающими доменами DARPin против EGFR и против

25 Her2. **б.** Модифицированные линии опухолевых клеток K562, трансдуцированные для экспрессии поверхностных маркеров Her2+/eGFP+, EGFR+/iRFP+ или Her2+/eGFP+ и EGFR+/iRFP+. **с.** Анализ функционального восстановления Her2-нацеленных вариантов Neo2A (aHer2Neo2A1, aHer2Neo2A2 и aHer2Neo2A3) и EGFR-нацеленных вариантов Neo2B (Neo2B1-aEGFR, Neo2B2-aEGFR и Neo2B3-aEGFR) на поверхности четырех

30 упомянутых выше линий клеток K562. Все линии клеток смешивали в эквивалентном соотношении (50000 клеток каждого типа на лунку) и переносили в планшет с V-образным дном при 200000 клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с эквимолярным соотношением вариантов анти-Her2-Neo2, анти-Her2-Neo2A + анти-EGFR-Neo2B до конечной концентрации 10 нМ в буфере для FACS

35 (ФСБ (Gibco), 0,5% БСА). После этого клетки дважды промывали (ФСБ (Gibco), 0,5%

БСА) и затем инкубировали в течение 5 минут со следующими компонентами: 50 нМ биотинилированного растворимого человеческого общего гамма-рецептора, 50 нМ растворимого человеческого IL-2R $\beta$  и 15 нМ конъюгата стрептавидин-фикоэритрин (SAPE). Клетки снова промывали и анализировали методом проточной цитометрии на приборе LSRII. Клетки Her2<sup>+</sup> были отсортированы по флуоресценции eGFP (Ex/Em = 488/508), клетки EGFR<sup>+</sup> были отсортированы по флуоресценции iRFP (Ex/Em = 637/670), клетки Her2<sup>+</sup>/EGFR<sup>+</sup> были идентифицированы по одновременной экспрессии eGFP и iRFP. Восстановление активности неолейкина-2/15 и связывание с рецептором IL-2 идентифицировали путем анализа флуоресценции ФЭ (Ex/Em = 561/582) на поверхности каждой подгруппы клеток.

### **Фигура 19А-С. Оба фрагмента вариантов расщепленного Neo-2/15**

**необходимы для обеспечения функционального восстановления на поверхности**

**клеток K562, экспрессирующих Her2 и EGFR. а.** Анализ функционального

восстановления Her2-нацеленных вариантов Neo2A (aHer2-Neo2A1) и EGFR-нацеленных вариантов Neo2B (Neo2B1-aEGFR) на поверхности четырех линий клеток K562, экспрессирующих следующие маркеры: без маркеров, Her2<sup>+</sup>/eGFP<sup>+</sup>, EGFR<sup>+</sup>/iRFP<sup>+</sup>, Her2<sup>+</sup>/eGFP<sup>+</sup>/EGFR<sup>+</sup>/iRFP<sup>+</sup>. Все линии клеток смешивали в эквивалентном соотношении (50000 клеток каждого типа на лунку) и переносили в планшет с V-образным дном при 200000 клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с анти-Her2-Neo2A1, Neo2B1-анти-EGFR или анти-Her2-Neo2A1 + Neo2B1-анти-EGFR до конечной концентрации 810 нМ в буфере для FACS (ФСБ (Gibco), 0,5% БСА). После этого клетки дважды промывали (ФСБ (Gibco), 0,5% БСА) и затем инкубировали в течение 5 минут со следующими компонентами: 50 нМ биотинилированного растворимого человеческого общего гамма-рецептора, 50 нМ растворимого человеческого IL-2R $\beta$  и 15 нМ конъюгата стрептавидин-фикоэритрин (SAPE). Клетки снова промывали и анализировали методом проточной цитометрии на приборе LSRII. Клетки Her2<sup>+</sup> были отсортированы по флуоресценции eGFP (Ex/Em = 488/508), клетки EGFR<sup>+</sup> были отсортированы по флуоресценции iRFP (Ex/Em = 637/670), клетки Her2<sup>+</sup>/EGFR<sup>+</sup> были идентифицированы по одновременной экспрессии eGFP и iRFP. Восстановление активности неолейкина-2/15 и связывание с рецептором IL-2 идентифицировали путем анализа флуоресценции ФЭ (Ex/Em = 561/582) на поверхности каждой подгруппы клеток. Как было замечено, оба фрагмента необходимы для восстановления функциональной активности неолейкина-2/15 на поверхности дважды положительных клеток. **б.** Анализ, аналогичный описанному в (а), с использованием

aHer2-Neo2A2 и Neo2B2-aEGFR. с. Анализ, аналогичный описанному в (а), с использованием aHer2-Neo2A3 и Neo2B3-aEGFR.

**Фигура 20А-В. Иллюстрация альтернативных способов действия платформы расщепленного Neo-2 для высокоспецифичной активации подтипов иммунных**

5 **клеток. а.** Селективное нацеливание расщепленного Neo-2 на два поверхностных маркера для стимуляции размножения определенного подтипа иммунных клеток (например, CD8<sup>+</sup>, CAR Т-клеток или регуляторных Т-клеток) **б.** Одновременное нацеливание на опухоль и Т-клетку с помощью системы расщепленного неолейкина-2/15 для индукции специфической пролиферации подгруппы иммунных клеток в окружении целевых  
10 опухолевых клеток.

**Фигура 21А. Фрагменты расщепленного неолейкина-4 могут восстанавливать полную активность при объединении.** Анализ связывания методом интерферометрии

биослоя Neo-4, расщепленного на спирали Н1 (Neo4A1) + Н3-Н2'-Н4 (Neo4B1), с человеческим рецептором IL-4. Данные по связыванию собирали в Octet RED96 (ForteBio)  
15 и обрабатывали с использованием программного обеспечения для анализа данных ForteBio™, версия 9.0.0.10. Биотинилированный человеческий целевой рецептор с был иммобилизован на покрытых стрептавидином биосенсорах (SA ForteBio) при 1 мкг/мл в связывающем буфере (10 мМ HEPES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% сурфактанта P20, 0,5% обезжиренного сухого молока) в течение 300 секунд. После  
20 загрузки целевого рецептора на биосенсор выполняли измерение начального уровня только в связывающем буфере, после этого контролировали кинетики связывания, погружая биосенсоры в лунки, содержащие целевой белок в указанной концентрации (этап ассоциации), а затем погружая сенсоры обратно в начальные условия/буфер (диссоциация). На этапе ассоциации анализируемые белки (то есть неолейкин-4, Neo4A1,  
25 Neo4B1 и эквимолярное соотношение Neo4A1 + Neo4B1) разбавляли из концентрированных исходных растворов в связывающем буфере до конечной концентрации 100 нМ, в раствор также добавляли человеческий IL-4Rα в насыщающей концентрации (250 нМ).

### 30 **Подробное описание изобретения**

В контексте настоящего документе, если не указано иное, термины в единственном числе означают «один», «по меньшей мере один» или «один или более». Если иное не следует из контекста, термины в единственном числе, используемые в настоящем

документе, включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число.

Если из контекста явно не следует иное, во всем описании и формуле изобретения слова «содержит», «содержащий» и тому подобное следует толковать во включительном смысле, а не в исключительном или исчерпывающем смысле; то есть, как означающие «включая, не ограничиваясь перечисленным». Слова в единственном или множественном числе также включают множественное или единственное число, соответственно. Кроме того, слова «в настоящем документе», «выше» и «ниже» и слова аналогичного значения в контексте настоящей заявки относятся к данной заявке в целом, а не к каким-либо конкретным частям данной заявки.

В контексте настоящего документа аминокислотные остатки сокращены следующим образом: аланин (Ala; A), аспарагин (Asn; N), аспарагиновая кислота (Asp; D), аргинин (Arg; R), цистеин (Cys; C), глутаминовая кислота (Glu; E), глутамин (Gln; Q), глицин (Gly; G), гистидин (His; H), изолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V).

Все варианты реализации любого аспекта изобретения могут быть использованы в комбинации, если из контекста явно не следует иное.

Согласно первому аспекту настоящего раскрытия предложены неприродные условно активные агонисты рецептора, содержащие первый полипептидный компонент и второй полипептидный компонент, причем указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный компонент не присутствуют в слитом белке, при этом в целом указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный компонент содержат домены X1, X2, X3 и X4, при этом:

a) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDALL(MILNI) (SEQ ID NO:4);

(b) X2 представляет собой любой спиральный пептидный домен;

(c) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5); и

(d) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%,

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6).

при этом:

- (i) аминокислотные остатки в скобках могут присутствовать или  
5 отсутствовать;
- (ii) указанный первый полипептидный компонент содержит по меньшей мере один из X1, X2, X3 и X4, но не содержит каждый из X1, X2, X3 и X4; и
- (iii) указанный второй полипептидный компонент содержит каждый из X1, X2, X3 и X4, который не присутствует в первом полипептидном компоненте;
- 10 при этом указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный компонент не являются активными агонистами рецептора по отдельности, и при этом указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептид взаимодействуют с образованием активного агониста гетеродимера  $\beta_c$  рецептора IL-2 (IL-2R $\beta_c$ ), гетеродимера  $\alpha_c$  рецептора IL-4 (IL-4R $\alpha_c$ ), IL-13 альфа или гетеродимера IL-4Rальфа/IL13Rальфа.
- 15

Как показано в примерах ниже, как подробно описано в заявке РСТ с серийным номером РСТ/US2019/038703, поданной 29 июня 2019 г., и как описано в Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019, ранее было показано, что полипептиды, которые  
20 содержат все из X1-X4, являются (а) миметиками IL-2 и интерлейкина-15 (IL-15), которые связываются с гетеродимером  $\beta_c$  рецептора IL-2 (IL-2R $\beta_c$ ), но не имеют сайта связывания для IL-2R $\alpha$  или IL-15R $\alpha$ , или (б) миметиками IL-4, которые связываются с гетеродимером  $\alpha_c$  рецептора IL-4 (IL-4R $\alpha_c$ ) или с  $\alpha$ -субъединицей рецептора IL-13 (IL-13R $\alpha$ ) (природный IL-4 и миметики IL-4, описанные в настоящей заявке, перекрестно реагируют с рецептором IL-13, образуя гетеродимер IL-4R $\alpha$ /IL13R $\alpha$ ). Было показано, что  
25 полноразмерные полипептиды сверхустойчивы, связываются с человеческим и мышинным IL-2R $\beta_c$  или IL-4R $\alpha_c$  с более высокой аффинностью, чем природные цитокины, а также вызывают нижележащую передачу клеточных сигналов, независимую от IL-2R $\alpha$  и IL-15R $\alpha$  или независимую от IL-13R $\alpha$ . Полноразмерные полипептиды можно применять, например, для лечения рака.

30 Напротив, настоящее раскрытие неожиданно демонстрирует условно активные агонисты рецептора, содержащие перечисленные отдельные первый и второй полипептиды, которые по отдельности не являются агонистами рецептора, но которые могут нековалентно взаимодействовать с образованием активного агониста гетеродимера  $\beta_c$  рецептора IL-2 (IL-2R $\beta_c$ ), гетеродимера  $\alpha_c$  рецептора IL-4 (IL-4R $\alpha_c$ ), IL-13 альфа или  
35 гетеродимера IL-4Rальфа/IL13Rальфа. Аффинность этого нековалентного

взаимодействия между «расщепленными компонентами» (то есть: первым полипептидом и вторым полипептидом) такова, что взаимодействие происходит только в присутствии соответствующего рецептора, а также только в том случае, когда оба расщепленных компонента совместно локализованы. Таким образом, условно активные агонисты рецептора согласно настоящему раскрытию можно применять для любых вариантов применения, для которых могут применяться полипептиды, которые содержат все из X1-X4. Кроме того, условно активные агонисты рецептора делают возможным зависимое от совместной локализации восстановление агониста и, таким образом, условную активацию рецептора.

В настоящей заявке термин «миметик белка» относится к белку, который имитирует определенные аспекты функции другого белка. Эти два белка обычно имеют разные аминокислотные последовательности и/или разные структуры. В настоящей заявке, помимо прочего, предложены условно активные миметики IL-2 и IL-15. Аспекты функции IL-2 и IL-15, которые имитируют эти условно активные миметики, представляют собой индукцию гетеродимеризации IL-2R $\beta_c$ , приводящей к фосфорилированию STAT5. Поскольку как IL-2, так и IL-15 передают сигнал посредством гетеродимеризации IL-2R $\beta_c$ , эти условно активные миметики имитируют данную биологическую функцию как IL-2, так и IL-15. В настоящей заявке эти условно активные миметики могут называться миметиками IL-2, IL-15 или обоих IL-2 и IL-15.

Также предложены условно активные миметики IL-4. Эти условно активные миметики способны имитировать определенные функции IL-4. Функция IL-4, которую имитируют эти миметики, заключается в индукции гетеродимеризации IL-4R $\alpha_c$  (и/или гетеродимеризации IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ ).

Согласно одному варианту реализации первый полипептидный компонент и второй полипептид взаимодействуют с образованием агониста гетеродимера  $\beta_c$  рецептора IL-2 (IL-2R $\beta_c$ ). Согласно другому варианту реализации первый полипептидный компонент и второй полипептид взаимодействуют с образованием агониста гетеродимера  $\alpha_c$  рецептора IL-4 (IL-4R $\alpha_c$ ), IL-13 альфа или гетеродимера IL-4Rальфа/IL13Rальфа.

Нативный hIL-2 состоит из четырех спиралей, соединенных длинными нерегулярными петлями. N-концевая спираль (H1) взаимодействует как с бета-, так и с гамма-субъединицами, третья спираль (H3) взаимодействует с бета-субъединицей, а C-концевая спираль (H4) - с гамма-субъединицей; поверхность взаимодействия альфа-субъединицы образована нерегулярной второй спиралью (H2) и двумя длинными петлями, одна из которых соединяет H1 и H2, а другая - H3 и H4. Были смоделированы и получены идеализированные белки, в которых H1, H3 и H4 заменены идеализированными

структурными доменами, включая, не ограничиваясь перечисленным, спирали и бета-цепи (называемыми доменами X1, X3 и X4, соответственно), демонстрирующие поверхность связывания  $\text{IL-2R}\beta_c$  или  $\text{IL-4R}\alpha_c$ , основанную на H1, H3 и H4, и в которой H2 заменен идеализированной спиралью (называемой доменом X2), которая обеспечивает лучшую упаковку. Как показано в примерах, были проведены обширные мутационные исследования, демонстрирующие, что аминокислотная последовательность каждого пептидного домена может быть значительно модифицирована без потери связывания с рецептором IL-2 или IL-4, и что домены могут быть размещены в любом порядке с сохранением условного связывания с рецептором IL-2 или IL-4. Полипептиды могут содержать L-аминокислоты и глицин, D-аминокислоты и глицин или их комбинации. Как описано в настоящей заявке, идеализированные белки можно расщепить на два полипептида, которые по отдельности незначительно связываются с соответствующим рецептором, но при смешивании могут восстанавливать активность рецептора. Как правило, белки расщепляют в сайтах, которые не будут нарушать функцию белка (например, линкерные участки в вариантах реализации с линкерами). Кроме того, подобно тому, как домены X1, X2, X3 и X4 в нерасщепленных белках могут быть объединены вместе в петлю в любом порядке, расщепленные белки могут содержать любую комбинацию доменов.

Таким образом, X1, X2, X3 и X4 могут присутствовать в любом порядке в первом и втором полипептиде; в неограничивающих вариантах:

- (i) указанный первый полипептид содержит X1, и указанный второй полипептид содержит X2, X3 и X4;
- (ii) указанный первый полипептид содержит X2, и указанный второй полипептид содержит X1, X3 и X4;
- (iii) указанный первый полипептид содержит X3, и указанный второй полипептид содержит X1, X2 и X4;
- (iv) указанный первый полипептид содержит X4, и указанный второй полипептид содержит X1, X2 и X3;
- (v) указанный первый полипептид содержит X1 и X2, и указанный второй полипептид содержит X3 и X4;
- (vi) указанный первый полипептид содержит X1 и X3, и указанный второй полипептид содержит X2 и X4;
- (vii) указанный первый полипептид содержит X1 и X4, и указанный второй полипептид содержит X2 и X3;

(viii) указанный первый полипептид содержит X2 и X3, и указанный второй полипептид содержит X1 и X4;

(ix) указанный первый полипептид содержит X2 и X4, и указанный второй полипептид содержит X1 и X3;

5 (x) указанный первый полипептид содержит X3 и X4, и указанный второй полипептид содержит X1 и X2;

(xi) указанный первый полипептид содержит X1, X2 и X3, и указанный второй полипептид содержит X4;

10 (xii) указанный первый полипептид содержит X1, X2 и X4, и указанный второй полипептид содержит X3;

(xiii) указанный первый полипептид содержит X1, X3 и X4, и указанный второй полипептид содержит X2; или

(xiv) указанный первый полипептид содержит X2, X3 и X4, и указанный второй полипептид содержит X1.

15 Когда первый полипептид и/или второй полипептид содержат более одного домена X1, X2, X3 и X4, в некоторых вариантах реализации эти домены могут быть разделены аминокислотными линкерами любой подходящей длины или аминокислотного состава. Линкеры не являются необходимыми; в одном из вариантов реализации линкеры между какими-либо доменами отсутствуют. Согласно другим вариантам реализации

20 аминокислотный линкер может присутствовать между 0, 1 или 2 соединениями между доменами X1, X2, X3 и X4 в первом полипептиде и/или втором полипептиде.

Аминокислотные линкеры могут иметь любую длину, которая считается подходящей для предполагаемого применения. В некоторых аспектах линкер находится на N-конце или C-

25 Согласно некоторым аспектам линкер называется линкером, поскольку он присутствовал в нерасщепленном белке и связывал два домена вместе.

Во всех этих вариантах реализации X1, X3 и X4 могут иметь любую подходящую длину, это означает, что каждый домен может содержать любое подходящее количество дополнительных аминокислот, отличных от пептидов из SEQ ID NO:4, 5 и 6,

30 соответственно. Остатки в скобках являются необязательными и, следовательно, могут присутствовать или отсутствовать. Как будет понятно специалистам в данной области техники, это означает, например, что 6 N-концевых аминокислот и 5 C-концевых аминокислотных остатков (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4) являются необязательными. Как будет далее понятно специалистам в данной области техники: (i)

35 если отсутствует одна N-концевая аминокислота, это будет наиболее N-концевая

аминокислота (то есть: N-концевой остаток P в SEQ ID NO:4); (ii) если отсутствуют две N-концевые аминокислоты, это будут две наиболее N-концевые аминокислоты (то есть N-концевой дипептид PK в SEQ ID NO:4); (iii) если отсутствует один C-концевой аминокислотный остаток, это будет наиболее C-концевая аминокислота (то есть: C-концевой остаток I в SEQ ID NO:4); (iv) если отсутствуют два C-концевых аминокислотных остатка, это будут две наиболее C-концевые аминокислоты (то есть: C-концевой дипептид NI в SEQ ID NO:4) и т. д. Таким образом, специалисты в данной области техники поймут, что один или более необязательных аминокислотных остатков могут отсутствовать и что отсутствующие аминокислоты из необязательных остатков являются смежными от соответствующего пептидного конца, как проиллюстрировано выше.

Согласно одному варианту реализации X1 содержит пептид, идентичный полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4); X3 содержит пептид, идентичный полной длине пептида (LE)DYAFNFELLILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5); и X4 содержит пептид, идентичный полной длине пептида (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6), соответственно, по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100%.

Согласно различным вариантам реализации X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4) или (PKKKI)QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4), X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (LE)DYAFNFELLILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELLILEEIARLFES(G) (SEQ ID NO:5); и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или (E)DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:6), соответственно, по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100%.

Согласно конкретным вариантам реализации;

(i) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4) или (PKKKI)QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) по меньшей мере на 70%, X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (LE)DYAFNFELLILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5) или

LEDYAFNFELILEEIARLFES(G) (SEQ ID NO:5) по меньшей мере на 70%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (E)DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или (E)DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:6) по меньшей мере на 70%;

5 (ii) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4) или (PKKKI)QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) по меньшей мере на 70%, X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES(G) (SEQ ID NO:5) по меньшей мере на 70%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (E)DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или (E)DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:6) по меньшей мере на 70%;

15 (iii) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4) или (PKKKI)QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) по меньшей мере на 85%, X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES(G) (SEQ ID NO:5) по меньшей мере на 85%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (E)DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или (E)DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:6) по меньшей мере на 85%;

25 (iv) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность со 100% идентичностью полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4) или (PKKKI)QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4), X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность со 100% идентичностью полной длине пептида (LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES(G) (SEQ ID NO:5); и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность со 100% идентичностью полной длине пептида (E)DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или (E)DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:6);

(v) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4) по меньшей мере на 85%, X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5) по меньшей мере на 85%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) по меньшей мере на 85%; или

(vi) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность со 100% идентичностью полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4), X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность со 100% идентичностью полной длине пептида (LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5); и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность со 100% идентичностью полной длине пептида (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6).

В этих вариантах реализации показаны разные варианты SEQ ID NO:4, 5 и 6, которые имеют одинаковую первичную аминокислотную последовательность, но отличаются положением необязательных остатков, отмеченных в скобках.

Согласно дополнительным вариантам:

X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320);

X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321); и/или

X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:322).

Согласно другому варианту реализации, в котором присутствуют необязательные остатки SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6,

а) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%,

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4);

(с) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5); и

(d) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида EDEQEEMANAITILSWIFS (SEQ ID NO:6).

Согласно другому варианту реализации, в котором присутствуют выбранные необязательные остатки SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6,

а) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320);

(с) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321); и

X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида или DEQEEMANAITILSWIF(S) (SEQ ID NO:322).

Согласно различным вариантам реализации, в которых присутствуют необязательные остатки SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4), X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321); и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида EDEQEEMANAITILSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAITILSWIF(S) (SEQ ID NO:322), соответственно, по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100%.

Согласно конкретным вариантам реализации;

- (i) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320) по меньшей мере на 65%;
- 5 X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321) по меньшей мере на 65%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида EDEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или
- 10 DEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:322) по меньшей мере на 65%;
- (ii) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320) по меньшей мере на 75%;
- X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или
- 15 LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321) по меньшей мере на 75%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида EDEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или
- DEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:322) по меньшей мере на 75%;
- 20 (iii) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320) по меньшей мере на 80%;
- X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или
- 25 LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321) по меньшей мере на 80%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида EDEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или
- DEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:322) по меньшей мере на 80%;
- (iv) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную
- 30 последовательность, идентичную полной длине пептида PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320) по меньшей мере на 90%;
- X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или
- LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321) по меньшей мере на 90%; и X4
- 35 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность,

идентичную полной длине пептида EDEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:322) по меньшей мере на 90%;

(v) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида PKKKIQLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:320) на 100%; X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида LEDYAFNFELILEEИARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEИARLFES (SEQ ID NO:321) на 100%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида EDEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAИТИЛQSWIFS (SEQ ID NO:322) на 100%.

(vi) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида PKKKIQLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:4) по меньшей мере на 80%; X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида LEDYAFNFELILEEИARLFESG (SEQ ID NO:5) по меньшей мере на 80%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида EDEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) по меньшей мере на 80%;

(vii) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида PKKKIQLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:4) по меньшей мере на 90%; X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида LEDYAFNFELILEEИARLFESG (SEQ ID NO:5) по меньшей мере на 90%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида EDEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) по меньшей мере на 90%;

(viii) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида PKKKIQLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:4) на 100%; X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида LEDYAFNFELILEEИARLFESG (SEQ ID NO:5) на 100%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида EDEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) на 100%;

(ix) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320) по меньшей мере на 80%; X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида

5 LEDYAFNFELLILEEIARLFES (SEQ ID NO:321) по меньшей мере на 80%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:322) по меньшей мере на 80%;

(x) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320) по меньшей мере на 90%; X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида LEDYAFNFELLILEEIARLFES (SEQ ID NO:321) по меньшей мере на 90%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:322) по меньшей мере на 90%; или

(xi) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320) на 100%; X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида LEDYAFNFELLILEEIARLFES (SEQ ID NO:321) на 100%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:322) на 100%.

Согласно одному варианту реализации условно активные агонисты рецептора представляют собой условно активные миметики агонистов рецептора IL-2/15 и

(i) X1 включает 1, 2, 3, 4 или все 5 из перечисленных далее: L в остатке 7, H в остатке 8, N в остатке 11, Y в остатке 14; M в остатке 18, при этом указанная нумерация относится к SEQ ID NO:4 на основании присутствия необязательных остатков; и/или

(ii) X3 включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все 8 из перечисленных далее: D в остатке 3, Y в остатке 4, F в остатке 6, N в остатке 7, L в остатке 10, I в остатке 11, E в остатке 13 или E в остатке 14, при этом указанная нумерация относится к SEQ ID NO:5 на основании присутствия необязательных остатков. Согласно дополнительному варианту реализации

(iii) X4 включает I в остатке 19, при этом указанная нумерация относится к SEQ ID NO:6 на основании присутствия необязательных остатков.

В SEQ ID NO:4, 5 и 6 ряд аминокислотных остатков выделен жирным шрифтом. В (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4): аминокислотные остатки E10, L13, Y14, D15 и L17 (пронумерованные в зависимости от присутствия необязательных остатков) выделены жирным шрифтом; в (LE)DYAFNFELLEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5): аминокислотные остатки L1, Y4, N7, L10, I11 и I15 (пронумерованные в зависимости от присутствия необязательных остатков) выделены жирным шрифтом; и в (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) аминокислотные остатки I12, Q16 и W18 (пронумерованные в зависимости от присутствия необязательных остатков) выделены жирным шрифтом.

10 Согласно одному варианту:

a) аминокислотные (AK) замены в X1 относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4 присутствуют не более чем в 3 остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 2 остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 1 остатке аминокислоты, выделенном жирным шрифтом, или не присутствуют в остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом;

(b) аминокислотные замены в X3 относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 присутствуют не более чем в 3 остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 2 остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 1 остатке аминокислоты, выделенном жирным шрифтом, или не присутствуют в остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом; и/или

(c) аминокислотные замены в X4 относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6 присутствуют не более чем в 2 остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 1 остатке аминокислоты, выделенном жирным шрифтом, или не присутствуют в остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом.

Согласно другому варианту реализации аминокислотные замены в X2 относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 не присутствуют в остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом.

Согласно другому варианту реализации условно активных миметиков агонистов рецептора IL-2 аминокислотные замены относительно референсных пептидных доменов (то есть SEQ ID NO:4, 5 или 6) не присутствуют в остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом. Как показано ниже, каждая из SEQ ID NO:4, 5 и 6 содержит остатки, выделенные жирным шрифтом, которые участвуют в связывании с рецептором:

- (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4): аминокислотные остатки E10, L13, Y14, D15 и L17 (пронумерованные на основании присутствия необязательных остатков) являются инвариантными в этом варианте реализации;
- (LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5) аминокислотные остатки L1, Y4, N7, L10, I11 и I15 (пронумерованные на основании присутствия необязательных остатков) являются инвариантными в этом варианте реализации; и
- (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) аминокислотные остатки I12, Q16 и W18 (пронумерованные на основании присутствия необязательных остатков) являются инвариантными в этом варианте реализации.

10 Согласно другому варианту реализации аминокислотный остаток W13 является инвариантным, когда X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7), при этом остатки в скобках  
15 являются необязательными. Согласно одному варианту реализации необязательный остаток присутствует; в другом варианте реализации необязательный остаток отсутствует.

Согласно другому варианту реализации условно активных миметиков агонистов рецептора IL-2 аминокислотные замены относительно референсных пептидных доменов (то есть SEQ ID NO:4, 5 или 6) не присутствуют более чем в 3, 2 или 1 остатках  
20 аминокислот, выделенных жирным шрифтом.

Согласно другому варианту реализации условно активные агонисты рецептора представляют собой условно активные миметики агонистов рецептора IL-4/IL-13 и

X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,  
25 85%, 90%, 95%, 98% или на 100% идентичную по ее длине пептиду PKKKIQIMAEEALKDALSILNI (SEQ ID NO:8);

X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 37%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%,  
30 98% или на 100% идентичную по ее длине пептиду LERFAKRFERNLWGIARLFESG (SEQ ID NO:9); и

X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,  
85%, 90%, 95%, 98% или на 100% идентичную по ее длине пептиду EDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:10).

35 где

(i) X1 включает I в остатке 7, T или M в остатке 8, E в остатке 11, K в остатке 14 и S в остатке 18; и

(ii) X3 включает R в остатке 3, F в остатке 4, K в остатке 6, R в остатке 7, R в остатке 10, N в остатке 11, W в остатке 13 и G в остатке 14.

5 Согласно дополнительному варианту реализации (iii) X4 включает F в остатке 19.

Согласно различным вариантам реализации X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине  
10 PKKKIQIMAEELKDALNIL (SEQ ID NO:8), X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине LERFAKRFERNLWGIARLFESG (SEQ ID NO:9), и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине EDEQEEMANAITILQSWFFS (SEQ ID NO:10), каждая из которых имеет идентичность  
15 по меньшей мере 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100%. Согласно конкретным вариантам реализации

(i) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65% идентична по своей длине пептиду PKKKIQIMAEELKDALNIL (SEQ ID NO:8); X3 представляет собой пептид,  
20 содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65% идентична по своей длине пептиду LERFAKRFERNLWGIARLFESG (SEQ ID NO:9); и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65% идентична по своей длине пептиду EDEQEEMANAITILQSWFFS (SEQ ID NO:10);

(ii) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична по своей длине пептиду PKKKIQIMAEELKDALNIL (SEQ ID NO:8); X3 представляет собой пептид,  
30 содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична по своей длине пептиду LERFAKRFERNLWGIARLFESG (SEQ ID NO:9); и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична по своей длине пептиду EDEQEEMANAITILQSWFFS (SEQ ID NO:10);

(iii) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична по своей длине пептиду  
35 PKKKIQIMAEELKDALNIL (SEQ ID NO:8); X3 представляет собой пептид,

содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична по своей длине пептиду **LERFAKRFERNLWGIARLFESG** (SEQ ID NO:9); и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична по своей длине пептиду **EDEQEEMANAИТИЛQSWFFS** (SEQ ID NO:10); или

(iv) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична по своей длине пептиду **PKKKIQIMAE**E**ALKDALSILNI** (SEQ ID NO:8); X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична по своей длине пептиду **LERFAKRFERNLWGIARLFESG** (SEQ ID NO:9); и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична по своей длине пептиду **EDEQEEMANAИТИЛQSWFFS** (SEQ ID NO:10);

в каждом случае, при этом

(A) X1 включает I в остатке 7, T или M в остатке 8, E в остатке 11, K в остатке 14 и S в остатке 18; и (B) X3 включает R в остатке 3, F в остатке 4, K в остатке 6, R в остатке 7, R в остатке 10, N в остатке 11, W в остатке 13 и G в остатке 14.

Согласно другому варианту реализации условно активных миметиков агонистов рецептора IL-4/ IL-13 аминокислотные замены относительно референсных пептидных доменов (то есть SEQ ID NO:8, 9 или 10) не присутствуют в остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом. Как показано ниже, каждая из SEQ ID NO:8, 9 и 10 содержит остатки, выделенные жирным шрифтом:

- **PKKKIQIMAE**E**ALKDALSILNI** (SEQ ID NO:8): аминокислотные остатки E10, E11, A12, L13, K14, D15, A16 и L17 являются инвариантными в этом варианте реализации.
- **LER**FAKRFERN**LWGIARLFESG** (SEQ ID NO:9): аминокислотные остатки F4, A5, K6, R7, F8, E9, R10 и N11 являются инвариантными в этом варианте реализации.
- **EDEQEEMANAИ**ТИЛQSWFFS**** (SEQ ID NO:10): аминокислотные остатки I11, I12, T13, I14, L15, Q16, S17, W18, F19 и F20 являются инвариантными в этом варианте реализации.

Согласно другому варианту реализации аминокислотный остаток W13 является инвариантным, когда X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида **KDEAEKAKRMKE**W**MKRIK(T)** (SEQ ID NO:7).

Согласно другому варианту реализации аминокислотные замены относительно референсных пептидных доменов представляют собой консервативные аминокислотные замены. В контексте настоящего документа термин «консервативная аминокислотная замена» означает, что данная аминокислота может быть заменена остатком, имеющим аналогичные физико-химические характеристики, например, замена одного алифатического остатка на другой (например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга), или замена одного полярного остатка на другой (например, между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn). Известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих схожие характеристики гидрофобности. Полипептиды, содержащие консервативные аминокислотные замены, могут быть испытаны в любом из описанных в настоящем документе анализов, чтобы подтвердить сохранение желаемой активности, например, антигенсвязывающей активности и специфичности нативного или референсного полипептида. Аминокислоты могут быть сгруппированы в соответствии с сходствами свойств их боковых цепей (в A. L. Lehninger, в Biochemistry, второе изд., стр. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)): (1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) незаряженные полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (c), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) кислые: Asp (D), Glu (E); (4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H). В качестве альтернативы, встречающиеся в природе остатки можно разделить на группы на основе общих свойств боковой цепи: 1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) кислые: Asp, Glu; (4) основные: His, Lys, Arg; (5) остатки, влияющие на ориентацию цепей: Gly, Pro; (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe. Неконсервативные замены повлекут за собой замену члена одного из этих классов на другой класс. Частные случаи консервативных замен включают, например, Ala на Gly или на Ser; Arg на Lys; Asn на Gln или на His; Asp на Glu; Cys на Ser; Gln на Asn; Glu на Asp; Gly на Ala или на Pro; His на Asn или на Gln; Ile на Leu или на Val; Leu на Ile или на Val; Lys на Arg, на Gln или на Glu; Met на Leu, на Tyr или на Ile; Phe на Met, на Leu или на Tyr; Ser на Thr; Thr на Ser; Trp на Tyr; Tyr на Trp; и/или Phe на Val, на Ile или на Leu.

30

В одном из вариантов реализации аминокислотные остатки в X1 относительно SEQ ID NO:4 выбраны из группы, состоящей из:

Положение 01:	A	F	I	L	M	P	Q	R	S	W
Положение 02:	A	D	E	G	V	K				
35 Положение 03:	D	E	F	W	K					

	Положение 04:	D	E	K	N	P	R	W	
	Положение 05:	D	E	H	I	K	L	M	S
	Положение 06:	A	D	E	G	L	P	S	W Q
	Положение 07:	D	E	L	Q	Y	I		
5	Положение 08:	A	F	H	W	Y	M	T	
	Положение 09:	C	F	P	A				
	Положение 10:	C	D	E	F	K	P		
	Положение 11:	D	F	H	E				
	Положение 12:	A	D	E	P	S	T	V	
10	Положение 13:	H	I	L	M	P	R	V	W
	Положение 14:	F	R	W	Y	K			
	Положение 15:	D	E	N	Y				
	Положение 16:	A	C	L	M	S			
	Положение 17:	F	I	L	M	P	R		
15	Положение 18:	G	M	Q	Y	S			
	Положение 19:	I	L	M	P	Q	V		
	Положение 20:	A	K	L	M	Q	R	S	
	Положение 21:	G	K	N	P	R	S	W	
	Положение 22:	D	E	I	K	M	N	W	Y
20									

Согласно одному варианту реализации условно активные агонисты рецептора представляют собой условно активные миметики IL-4 и положение 7 представляет собой I, положение 8 представляет собой M или T, положение 11 представляет собой E, положение 14 представляет собой K и положение 18 представляет собой S.

25 Согласно другому варианту реализации условно активные агонисты рецептора представляют собой условно активные миметики IL-2 и 1, 2, 3, 4 или 5 из перечисленных далее утверждений не являются истинными: положение 7 представляет собой I, положение 8 представляет собой M или T, положение 11 представляет собой E, положение 14 представляет собой K и положение 18 представляет собой S.

30

В еще одном варианте реализации аминокислотные остатки в X3 относительно SEQ ID NO:5 выбраны из группы, состоящей из:

	Положение 01:	A	L				
	Положение 02:	D	E	G	K	M	T
35	Положение 03:	D	E	N	Y	R	

	Положение 04:	C	D	G	T	Y	F		
	Положение 05:	A	F	H	S	V	W	Y	
	Положение 06:	A	F	I	M	T	V	Y	K
	Положение 07:	D	K	N	S	T	R		
5	Положение 08:	A	C	G	L	M	S	V	F
	Положение 09:	C	H	K	L	R	S	T	V E
	Положение 10:	F	I	L	M	Y	R		
	Положение 11:	I	L	N	T	Y			
	Положение 12:	F	K	L	M	S	V		
10	Положение 13:	A	D	F	G	I	N	P	Q S T E W
	Положение 14:	A	E	F	G	H	S	V	
	Положение 15:	C	I	L	M	V	W		
	Положение 16:	A	D	G	S	T	V		
	Положение 17:	H	K	L	N	R			
15	Положение 18:	C	D	G	I	L	Q	R	T W
	Положение 19:	D	F	M	N	W			
	Положение 20:	A	C	E	F	G	M	S	Y
	Положение 21:	D	E	G	H	L	M	R	S T V
									W
20	Положение 22:	A	D	G	K	N	S	Y	

Согласно другому варианту реализации условно активные агонисты рецептора представляют собой условно активные миметики IL-4/IL-13 и положение 3 представляет собой R, положение 4 представляет собой F, положение 6 представляет собой K, положение 7 представляет собой R, положение 10 представляет собой R, положение 11 представляет собой N, положение 13 представляет собой W и положение 14 представляет собой G.

Согласно другому варианту реализации условно активные агонисты рецептора представляют собой условно активные миметики IL-2 и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все 8 из перечисленных далее утверждений не являются истинными: положение 3 представляет собой R, положение 4 представляет собой F, положение 6 представляет собой K, положение 7 представляет собой R, положение 10 представляет собой R, положение 11 представляет собой N, положение 13 представляет собой W и положение 14 представляет собой G.

В любом из таких вариантов реализации условно активные агонисты рецептора дополнительно допускают наличие цистеина в положении 17 относительно SEQ ID NO:5 в

дополнение к аминокислотным остаткам H, K, L, N и R или в положении 20 относительно SEQ ID NO:5 в дополнение к аминокислотным остаткам A, C, E, F, G, M, S и Y.

Соответственно, в этом варианте реализации аминокислотные остатки в X3 относительно SEQ ID NO:5 могут быть выбраны из группы, состоящей из:

5

	Положение 01:	A	L										
	Положение 02:	D	E	G	K	M	T						
	Положение 03:	D	E	N	Y	R							
	Положение 04:	C	D	G	T	Y	F						
10	Положение 05:	A	F	H	S	V	W	Y					
	Положение 06:	A	F	I	M	T	V	Y	K				
	Положение 07:	D	K	N	S	T	R						
	Положение 08:	A	C	G	L	M	S	V	F				
	Положение 09:	C	H	K	L	R	S	T	V	E			
15	Положение 10:	F	I	L	M	Y	R						
	Положение 11:	I	L	N	T	Y							
	Положение 12:	F	K	L	M	S	V						
	Положение 13:	A	D	F	G	I	N	P	Q	S	T	E	W
	Положение 14:	A	E	F	G	H	S	V					
20	Положение 15:	C	I	L	M	V	W						
	Положение 16:	A	D	G	S	T	V						
	Положение 17:	H	K	L	N	R	C						
	Положение 18:	C	D	G	I	L	Q	R	T	W			
	Положение 19:	D	F	M	N	W							
25	Положение 20:	A	C	E	F	G	M	S	Y	C			
	Положение 21:	D	E	G	H	L	M	R	S	T	V		
	W												
	Положение 22:	A	D	G	K	N	S	Y					

30

В еще одном варианте реализации аминокислотные остатки в X4 относительно SEQ ID NO:6 выбраны из группы, состоящей из:

	Положение 01:	D	E	G	K	V		
	Положение 02:	D	I	M	S			
	Положение 03:	E	G	H	K			
35	Положение 04:	E	G	I	K	Q	R	S

	Положение 05:	A	D	E	G	H	S	V			
	Положение 06:	C	D	E	G	I	M	Q	R	T	V
	Положение 07:	C	E	L	M	P	R	T			
	Положение 08:	A	F	L	M	W					
5	Положение 09:	A	G	L	N	Q	R	T			
	Положение 10:	A	C	D	E	F	H	I	W		
	Положение 11:	I	M	N	S	V	W				
	Положение 12:	I	K	L	S	V					
	Положение 13:	C	L	M	R	S	T				
10	Положение 14:	I	L	P	T	Y					
	Положение 15:	F	G	I	L	M	N	V			
	Положение 16:	H	K	Q	R						
	Положение 17:	C	F	K	S	W	Y				
	Положение 18:	K	Q	T	W						
15	Положение 19:	C	G	N	I						
	Положение 20:	C	F	G	L	Y					
	Положение 21:	A	F	G	H	S	Y				

Согласно другому варианту реализации условно активные агонисты рецептора представляют собой условно активные миметики IL-4/IL-13 и положение 19 представляет собой I. Согласно другому варианту реализации условно активные агонисты рецептора представляют собой условно активные миметики IL-2 и положение 19 не является I.

В любом из таких вариантов реализации условно активные агонисты рецептора дополнительно допускают наличие цистеина в положении 3 относительно SEQ ID NO:6 в дополнение к аминокислотным остаткам E, G, H и K. Соответственно, в этом варианте реализации аминокислотные остатки в X4 относительно SEQ ID NO:6 могут быть выбраны из группы, состоящей из:

	Положение 01:	D	E	G	K	V					
	Положение 02:	D	I	M	S						
	Положение 03:	E	G	H	K	C					
30	Положение 04:	E	G	I	K	Q	R	S			
	Положение 05:	A	D	E	G	H	S	V			
	Положение 06:	C	D	E	G	I	M	Q	R	T	V
	Положение 07:	C	E	L	M	P	R	T			
	Положение 08:	A	F	L	M	W					
35	Положение 09:	A	G	L	N	Q	R	T			

	Положение 10:	A	C	D	E	F	H	I	W
	Положение 11:	I	M	N	S	V	W		
	Положение 12:	I	K	L	S	V			
	Положение 13:	C	L	M	R	S	T		
5	Положение 14:	I	L	P	T	Y			
	Положение 15:	F	G	I	L	M	N	V	
	Положение 16:	H	K	Q	R				
	Положение 17:	C	F	K	S	W	Y		
	Положение 18:	K	Q	T	W				
10	Положение 19:	C	G	N	I				
	Положение 20:	C	F	G	L	Y			
	Положение 21:	A	F	G	H	S	Y		

Как отмечено в настоящей заявке, домен X2 представляет собой структурный домен и, следовательно, может быть использована любая аминокислотная последовательность, которая соединяет (то есть в том же полипептиде или при нековалентном взаимодействии первого и второго полипептида) соответствующие другие домены и позволяет им складываться. Требуемая длина будет зависеть от специфики используемого первого полипептида и второго полипептида и может составлять 8 аминокислот или более. Согласно одному примерному и неограничивающему варианту реализации X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 20%, 27%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична по своей длине KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7) или KDEAEKAKRMKEWMKRIKT (SEQ ID NO:7). Согласно одному варианту реализации аминокислотные изменения относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 представляют собой консервативные аминокислотные замены. Согласно другому варианту реализации аминокислотный остаток W13 является инвариантным. Согласно дополнительному варианту реализации аминокислотные остатки в X2 относительно SEQ ID NO:7 выбраны из группы, состоящей из:

	Положение 01:	A	H	L	M	R	S	V	K		
	Положение 02:	A	D	E	Q	R	S	T	V	W	Y
	Положение 03:	C	E	G	K	L	N	Q	R	W	
	Положение 04:	A	F	G	N	S	T	V	Y		
35	Положение 05:	A	E	G	I	M	R	V			

	Положение 06:	C	E	K	L	N	R	V			
	Положение 07:	A	C	E	I	L	S	T	V	W	
	Положение 08:	H	K	L	M	S	T	W	Y		
	Положение 09:	A	I	L	M	Q	S	R			
5	Положение 10:	A	I	M	S	W	Y				
	Положение 11:	C	I	K	L	S	V				
	Положение 12:	C	E	K	L	P	Q	R	T		
	Положение 13:	A	D	H	N	W					
	Положение 14:	A	C	G	I	L	S	T	V	M	
10	Положение 15:	A	E	G	I	K	L	M	R	V	
	Положение 16:	G	H	L	R	S	T	V			
	Положение 17:	A	I	L	V						
	Положение 18:	A	C	D	E	G	H	I	K	M	S
	Положение 19:	D	E	G	L	N	V	T			

15 В еще одном варианте реализации полипептиды являются миметиками PL-4/PL-13, и положение 11 представляет собой I. В еще одном варианте реализации полипептиды являются миметиками PL-2, и положение 11 не является I.

В любом из таких вариантов реализации полипептид дополнительно допускает наличие цистеина в положениях 5 или 16 относительно SEQ ID NO:7.

20 В качестве альтернативы, в любом из таких вариантов реализации полипептид дополнительно допускает наличие цистеина в положениях 1, 2, 5, 9 или 16 относительно SEQ ID NO:7.

Соответственно, аминокислотные остатки в X2 относительно SEQ ID NO:7 могут быть выбраны из группы, состоящей из:

25	Положение 01:	A	H	L	M	R	S	V	K	C	
	Положение 02:	A	D	E	Q	R	S	T	V	W	Y
		C									
	Положение 03:	C	E	G	K	L	N	Q	R	W	
	Положение 04:	A	F	G	N	S	T	V	Y		
30	Положение 05:	A	E	G	I	M	R	V	C		
	Положение 06:	C	E	K	L	N	R	V			
	Положение 07:	A	C	E	I	L	S	T	V	W	
	Положение 08:	H	K	L	M	S	T	W	Y		
	Положение 09:	A	I	L	M	Q	S	R	C		
35	Положение 10:	A	I	M	S	W	Y				

Положение 11:	C	I	K	L	S	V				
Положение 12:	C	E	K	L	P	Q	R	T		
Положение 13:	A	D	H	N	W					
Положение 14:	A	C	G	I	L	S	T	V	M	
5 Положение 15:	A	E	G	I	K	L	M	R	V	
Положение 16:	G	H	L	R	S	T	V	C		
Положение 17:	A	I	L	V						
Положение 18:	A	C	D	E	G	H	I	K	M	S
Положение 19:	D	E	G	L	N	V	T			

10 Согласно различным конкретным вариантам реализации:

(i) X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична по своей длине KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7);

15 (ii) X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична по своей длине KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7);

(iii) X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична по своей длине KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7);

20 (iv) X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7) по меньшей мере на 65%; X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320) по меньшей мере на 65%; X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321) по меньшей мере на 65%; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида EDEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:322) по меньшей мере на 65%;

30 (v) X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7) по меньшей мере на 75%; X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида

35

PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320) по меньшей мере на 75%; X3 представляет собой пептид, содержащий

аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида

LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID

5 NO:321) по меньшей мере на 75%; и X4 представляет собой пептид, содержащий

аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида

EDEQEEMANAИTILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAИTILQSWIFS (SEQ ID

NO:322) по меньшей мере на 75%;

(vi) X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

10 последовательность, идентичную полной длине пептида KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T)

(SEQ ID NO:7) по меньшей мере на 80%; X1 представляет собой пептид, содержащий

аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида

PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID

NO:320) по меньшей мере на 80%; X3 представляет собой пептид, содержащий

15 аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида

LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID

NO:321) по меньшей мере на 80%; и X4 представляет собой пептид, содержащий

аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида

EDEQEEMANAИTILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAИTILQSWIFS (SEQ ID

20 NO:322) по меньшей мере на 80%;

(vii) X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, идентичную полной длине пептида KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T)

(SEQ ID NO:7) по меньшей мере на 90%; X1 представляет собой пептид, содержащий

аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида

25 PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID

NO:320) по меньшей мере на 90%; X3 представляет собой пептид, содержащий

аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида

LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID

NO:321) по меньшей мере на 90%; и X4 представляет собой пептид, содержащий

30 аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида

EDEQEEMANAИTILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAИTILQSWIFS (SEQ ID

NO:322) по меньшей мере на 90%; или

(viii) X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, имеющую 100% идентичность полной длине пептида

35 KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7); X1 представляет собой пептид,

содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность полной длине пептида PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320); X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность полной длине пептида LEDYAFNFELLILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELLILEEIARLFES (SEQ ID NO:321); и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность полной длине пептида EDEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:322).

10 В примерных вариантах реализации с (i) по (viii) выше присутствуют перечисленные необязательные аминокислотные остатки в SEQ ID NO:7. Согласно примерным вариантам реализации с (i) по (viii) выше пептиды для X1, X3 и X4 показаны в SEQ ID NO:4, 5 и 6. Согласно примерным вариантам реализации с (i) по (viii) выше пептиды для X1, X3 и X4 показаны в SEQ ID NO:320, 321 и 322.

15 Согласно различным вариантам реализации:

(i) первый полипептидный компонент содержит один из X1, X2, X3 и X4, а второй полипептидный компонент содержит три из X1, X2, X3 и X4, которые не присутствуют в первом полипептидном компоненте; или

(ii) первый полипептидный компонент содержит два из X1, X2, X3 и X4, а 20 второй полипептидный компонент содержит два из X1, X2, X3 и X4, которые не присутствуют в первом полипептидном компоненте.

Согласно дополнительным вариантам реализации;

а) первый полипептид содержит X1 и не содержит X2, X3 и X4; и второй полипептид представляет собой слитый белок, содержащий X3-Z1-X2-Z2-X4 и не 25 содержащий X1;

(b) первый полипептид содержит X4 и не содержит X1, X2 и X3; и второй полипептид представляет собой слитый белок, содержащий X1-Z1-X3-Z2-X2 и не содержащий X4; или

(c) первый полипептид представляет собой слитый белок, содержащий X1-Z1- 30 X3 и не содержащий X2 и X4; и второй полипептид представляет собой слитый белок, содержащий X2-Z1-X4 и не содержащий X1 и X3;

причем каждый из Z1 и Z2 независимо представляет собой необязательный аминокислотный линкер. Z1 и/или Z2 могут содержать любое количество аминокислотных остатков для разделения доменов в первом и/или втором полипептиде, 35 которое считается подходящим для предусмотренного применения. Линкер 1 и/или Z2

может иметь любую подходящую длину и аминокислотный состав. Согласно одному варианту реализации Z1 и Z2 оба отсутствуют; согласно другому варианту реализации присутствуют оба 1 и 2; согласно дополнительному варианту реализации присутствует один из Z1 и Z2, а другой отсутствует.

- 5 Согласно другим вариантам реализации X1, X2, X3 и X4, соответственно, содержат пептид, который по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентичен, соответственно, полной длине доменов X1, X2, X3 и X4, показанных ниже (SEQ ID NO:4-7), при этом остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать:

10 X1: PKKKIQ~~L~~HAЕНA~~L~~YD~~A~~LMI~~L~~NI (SEQ ID NO:4)  
 X2: (K)DEAEKAKRMKE~~W~~MKRIKT (SEQ ID NO:7)  
 X3: (LE)DYAFN~~F~~ELI~~L~~EEIARLF(ESG) (SEQ ID NO:5)  
 X4: (E)DEQEEMANAIITIL~~Q~~SWIFS (SEQ ID NO:6)

- 15 Согласно другим вариантам реализации X1, X2, X3 и X4 представляют собой пептиды, содержащие аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны, соответственно, полной длине доменов X1, X2, X3 и X4, показанных ниже (SEQ ID NO:4-7), при этом остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать:

20 X1: PKKKIQ~~L~~HAЕНA~~L~~YD~~A~~LMI~~L~~NI (SEQ ID NO:4)  
 X2: (K)DEAEKAKRMKE~~W~~MKRIKT (SEQ ID NO:7)  
 X3: (LE)DYAFN~~F~~ELI~~L~~EEIARLF(ESG) (SEQ ID NO:5)  
 X4: (E)DEQEEMANAIITIL~~Q~~SWIFS (SEQ ID NO:6)

- 25 Согласно другим вариантам реализации X1, X2, X3 и X4 представляют собой пептиды, содержащие аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 90% идентичны, соответственно, полной длине доменов X1, X2, X3 и X4, показанных ниже (SEQ ID NO:4-7), при этом остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать:

30 X1: PKKKIQ~~L~~HAЕНA~~L~~YD~~A~~LMI~~L~~NI (SEQ ID NO:4)  
 X2: (K)DEAEKAKRMKE~~W~~MKRIKT (SEQ ID NO:7)  
 X3: (LE)DYAFN~~F~~ELI~~L~~EEIARLF(ESG) (SEQ ID NO:5)  
 X4: (E)DEQEEMANAIITIL~~Q~~SWIFS (SEQ ID NO:6) .

Согласно другим вариантам реализации X1, X2, X3 и X4 соответственно, на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентичны, соответственно, полной длине доменов X1, X2, X3 и X4, показанных ниже, при этом остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать:

- 5 X1: QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320)  
 X2: (K)DEAEKAKRMKEWMKRIKT (SEQ ID NO:7)  
 X3: LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321)  
 X4: DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:322).

10 Согласно другим вариантам реализации X1, X2, X3 и X4, соответственно, представляют собой пептиды, содержащие аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны, соответственно, полной длине доменов X1, X2, X3 и X4, показанных ниже, при этом остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать:

- 15 X1: QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320)  
 X2: (K)DEAEKAKRMKEWMKRIKT (SEQ ID NO:7)  
 X3: LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321)  
 X4: DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:322).

20 Согласно другим вариантам реализации X1, X2, X3 и X4, соответственно, представляют собой пептиды, содержащие аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 90% идентичны, соответственно, полной длине доменов X1, X2, X3 и X4, показанных ниже, при этом остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать:

- X1: QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320)  
 25 X2: (K)DEAEKAKRMKEWMKRIKT (SEQ ID NO:7)  
 X3: LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321)  
 X4: DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:322).

Согласно одному варианту реализации присутствуют одна или более или все необязательные аминокислоты; согласно другому варианту реализации одна или более  
 30 или все необязательные аминокислоты отсутствуют. Согласно другим вариантам реализации:

- (i) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:320 по меньшей мере на 55%; X2 представляет собой пептид,  
 35 содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине



аминокислотную последовательность, идентичную полной длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:322 по меньшей мере на 90%; или

- (vi) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность полной длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:320; X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность полной длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7; X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность полной длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:321; и X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность полной длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:322.

Согласно примерным вариантам реализации с (i) по (vi) выше пептиды для X1, X3 и X4 показаны в SEQ ID NO 4, 5 и 6. Согласно примерным вариантам реализации с (i) по (vi) выше пептиды для X1, X3 и X4 показаны в SEQ ID NO 320, 321 и 322.

Согласно другому варианту реализации первый полипептид и второй полипептид по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентичны паре первого и второго полипептидов, показанных ниже (подчеркнутые остатки или остатки «X» являются необязательными, и каждый остаток необязательного домена, когда он присутствует, может содержать любую аминокислоту):

(i)

Первый полипептид X1 (Neo2A) P K K K I Q L H A E N A L Y D A L M I L N I V K T N S (SEQ ID NO:256) и

Второй полипептид: X3-X2'-X4 (Neo2B)

T N S P P A E E K L E D Y A F N F E L I L E E I A R L F E S G D Q K D E A E K A K R M K E W M K R I K T T A S E D E Q E M A N A I I T I L Q S W I F S (SEQ ID NO:257)

(ii)

Первый полипептид X1-X3-X2'

P K K K I Q L H A E N A L Y D A L M I L N I V K T N S P P A E E K L E D Y A F N F E L I L E E I A R L F E S G D Q K D E A E K A K R M K E W M K R I K T T A S (SEQ ID NO:258) и

Второй полипептид X4 T T A S E D E Q E M A N A I I T I L Q S W I F S (SEQ ID NO:259);

35

(iii)

Первый полипептид X1-X3

PKKKIQQLHAENALYDALMILNIVKTNSPPAEEKLEDYAFNFELILEEIARLFESGD (SEQ ID NO:260) и

5 Второй полипептид X2-X4 DQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS  
(SEQ ID NO:261)

(iv)

Первый полипептид X1 (Neo4A) PKKKIQIMAEALKDALSILNIVKTNS (SEQ ID NO:262)

10

Второй полипептид X3-X2'-X4 (Neo4B)

TNSPPAEEQLERFKRFRNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMIEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:263)

15 (v)

Первый полипептид X1 (Neo2A) PKKKIQQLHAENALYDALMILNIXXXXXX (SEQ ID NO:311) и

Второй полипептид: X3-X2'-X4 (Neo2B)

20 XXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIARLFESGXXKDEAEKAKRMKEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:264)

(vi)

Первый полипептид X1-X3-X2'

PKKKIQQLHAENALYDALMILNXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIARLFESGXXKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTAS (SEQ ID NO:265) и

25 Второй полипептид X4 XXXXXDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:266);

(vii)

Первый полипептид X1-X3

30 PKKKIQQLHAENALYDALMILNXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIARLFESXXXGD (SEQ ID NO:267) и

Второй полипептид X2-X4 DQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:268)

35 (viii)

Первый полипептид X1 (Neo4A) PKKKIQIMAEALKDALSILNIXXXXXX (SEQ ID NO:269)

Второй полипептид X3-X2'-X4 (Neo4B)

XXXXXXXXXQLERFAKRFERNLWGIARLFESGXKDEAEKAKRMIEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITIL  
QSWFFS (SEQ ID NO:270)

5 (ix)

Первый полипептид >Neo4\_H1-H3'

PKKKIQIMAEELKDALSILNIVKTNSPPAEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGD (SEQ ID  
NO:312)

Второй полипептид >Neo4\_H2-H4

10 DQKDEAEKAKRMIEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:313)

(x)

Первый полипептид >Neo4\_H1-H3'

PKKKIQIMAEELKDALSILNIXXXXXXXXXXXQLERFAKRFERNLWGIARLFESXX (SEQ ID  
NO:314)

15 Второй полипептид >Neo4\_H2-H4

XXKDEAEKAKRMIEWMKRIKXXXXEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:315)

(xi)

Первый полипептид Neo4\_H1-H3'-H2

20 PKKKIQIMAEELKDALSILNIVKTNSPPAEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMIEW  
MKRIKTTA (SEQ ID NO:316)

Второй полипептид Neo4\_H4

TTASEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:317)

(xii)

Первый полипептид Neo4\_H1-H3'-H2

25 PKKKIQIMAEELKDALSILNIXXXXXXXXXXXLERFAKRFERNLWGIARLFESXXXKDEAEKAKRMIEW  
MKRIKXXX (SEQ ID NO:318)

Второй полипептид Neo4\_H4

XXXXXDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:319)

(xiii)

Первый полипептид (X1)

PKKKIQLHAENALYDALMILNIVGGSS (SEQ ID NO:323), или

SKEAIQLHAENALYDALMILNIVKTNS (SEQ ID NO:324), или

PIQLHAENALYDALMILNIV (SEQ ID NO:325)

5 Второй полипептид (X3-X2'-X4)

PKLEDYAFNFELILEEIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS  
(SEQ ID NO:326); или

GGSSGLEDYAFNFELILEEIARLFESGSSGKDEAEKAKRMKEWMKRITGGSSGDEQEEMANAIITIL  
LQSWIFS (SEQ ID NO:327); или

10 GGSSGLEDYAFNFELILEEIARLFESGGSSGGGGEAEKAKRMKEWMKRIGGGSSGDEQEEMANAIITIL  
QSWIFS (SEQ ID NO:328).

Согласно примерным вариантам реализации первый полипептид и второй полипептид представляют собой пептиды, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична паре первого и второго полипептидов, показанных в вариантах реализации (i)-(viii) выше (подчеркнутые остатки или остатки «X» являются необязательными, и каждый остаток необязательного домена, когда он присутствует, может содержать любую аминокислоту).

Согласно примерным вариантам реализации первый полипептид и второй полипептид представляют собой пептиды, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична паре первого и второго полипептидов, показанных в вариантах реализации (i)-(viii) выше (подчеркнутые остатки или остатки «X» являются необязательными, и каждый остаток необязательного домена, когда он присутствует, может содержать любую аминокислоту).

Согласно примерным вариантам реализации первый полипептид и второй полипептид представляют собой пептиды, содержащие аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична паре первого и второго полипептидов, показанных в вариантах реализации (i)-(viii) выше (подчеркнутые остатки или остатки «X» являются необязательными и каждый остаток необязательного домена, когда он присутствует, может содержать любую аминокислоту).

Согласно различным дополнительным вариантам реализации X1, X2, X3 и X4, соответственно, содержат пептид, который по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентичен,

соответственно, доменам X1, X2, X3 и X4 (определенным в Таблице 1 (при этом они перечислены как домены H1, H2, H3 и H4), присутствующим в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11-94, 190-216, 247 и SEQ ID NO:275-300.

В таблице 1 представлены две SEQ ID NO для многих из вариантов: первая SEQ ID NO: в которой положения линкеров перечислены как необязательные и переменные (показано подчеркиванием в таблице), и вторая SEQ ID NO: в которой положения линкеров указаны должным образом. В таблице 1 показана группировка доменов полипептида из SEQ ID NO:11-94, 190-216, 247 и SEQ ID NO:275-300 (см. вторую колонку), в то время как последовательность показывает подчеркнутые аминокислотные линкеры, разделяющие домены. См., например, SEQ ID NO:11, имеющую группировку доменов H1->H4->H2'-> H3 (соответствующую группировке X1-X4-X2-X3):

STKKWQLQAENHALLDWQMALNKSPENENLNRAITAAQSWISTGKIDLDKAEDIRNSDQARR  
EAEKRGIDVRDLISNAQVILLEAR (SEQ ID NO:11)

Как будет понятно специалистам в данной области техники на основании этой группировки, в SEQ ID NO:11 домен X1 представляет собой STKKWQLQAENHALLDWQMALNK (SEQ ID NO:271), домен X4 представляет собой ENLNRAITAAQSWIS (SEQ ID NO:272), домен X2 представляет собой LDKAEDIRNSDQARRAEK (SEQ ID NO:273) и домен X3 представляет собой RDLISNAQVILLEAR (SEQ ID NO:274). Аналогичным образом, аминокислотная последовательность каждого из доменов X1, X2, X3 и X4 из SEQ ID NO:11-94, 190-216, 247 и SEQ ID NO:275-300 будет ясна специалистам в данной области техники на основании принципов, изложенных в настоящей заявке. Как будет понятно специалистам в данной области техники, аминокислоты X1, X2, X3 и/или X4 могут включать дополнительные (1, 2, 3, 4, 5 или более) аминокислоты на N-конце и/или C-конце относительно доменов X1, X2, X3 и X4, показанных в SEQ ID NO:11-94, 190-216, 247 и SEQ ID NO:275-300.

**Таблица 1**

Название	Группировка доменов	Последовательность
G1_neo2_33	H1->H4->H2'->H3	STKKWQLQAENHALLDWQMALNKSPENENLNRAITAAQSWISTGKIDLDKAEDIRNSDQARR EAEKRGIDVRDLISNAQVILLEAR (SEQ ID NO:11) STKKWQLQAENHALLDWQMALNKSPENENLNRAITAAQSWISTGKIDLDKAEDIRNSDQARR EAEKRGIDVRDLISNAQVILLEAR (SEQ ID NO:103)
G1_neo2_34	H1->H4->H2'->H3	STKKWQLQAENHALLDWQMALNKSPENENLNRAITAAQSCISTGKCDLDKAEDIRNSDQARR EAEKRGIDVRDLISNAQVILLEAR (SEQ ID NO:12) STKKWQLQAENHALLDWQMALNKSPENENLNRAITAAQSCISTGKCDLDKAEDIRNSDQARR EAEKRGIDVRDLISNAQVILLEAR (SEQ ID NO:104)

G1_neo2_35	H1->H4- >H2' - >H3	STKKWQLQAEHALLDWQMALNKSPEPNENLNRAITAAQSWISTGKIDCDKAEDIRRNSDQARR EAEKRGIDVRDLISNAQVILILEAC (SEQ ID NO:13) STKKWQLQAEHALLDWQMALNKSPEPNENLNRAITAAQSWISTGKIDCDKAEDIRRNSDQARR EAEKRGIDVRDLISNAQVILILEAC (SEQ ID NO:105)
G1_neo2_36	H1->H4- >H2' - >H3	STKKLQLQAEHFLLDVQMILNESPEPNEELNRAITDAQSWISTGKIDLDRAEELARNLEKVRD EALKRGIDVRDLVSNKVIKVALELK (SEQ ID NO:14) STKKLQLQAEHFLLDVQMILNESPEPNEELNRAITDAQSWISTGKIDLDRAEELARNLEKVRD EALKRGIDVRDLVSNKVIKVALELK (SEQ ID NO:106)
G1_neo2_37	H1->H4- >H2' - >H3	STKKLQLQAEHFLLDVQMILNESPEPNEELNRCITDAQSWISTGKIDLDRAEELARNLEKVRD EALKRGIDVRDLVSNKVIKVALELK (SEQ ID NO:15) STKKLQLQAEHFLLDVQMILNESPEPNEELNRCITDAQSWISTGKIDLDRAEELARNLEKVRD EALKRGIDVRDLVSNKVIKVALELK (SEQ ID NO:107)
G1_neo2_38	H1->H4- >H2' - >H3	STKKLQLQAEHFLLDVQMILNESPEPNEELNRAITDAQSCISTGKCDLDRAEELARNLEKVRD EALKRGIDVRDLVSNKVIKVALELK (SEQ ID NO:16) STKKLQLQAEHFLLDVQMILNESPEPNEELNRAITDAQSCISTGKCDLDRAEELARNLEKVRD EALKRGIDVRDLVSNKVIKVALELK (SEQ ID NO:108)
G1_neo2_39	H1->H4- >H2' - >H3	STKKLQLQAEHFLLDVQMILNESPEPNEELNRAITDAQSWISTGKIDLDRAEELCRNLEKVRD EALKRGIDVRDLVSNACVIKVALELK (SEQ ID NO:17) STKKLQLQAEHFLLDVQMILNESPEPNEELNRAITDAQSWISTGKIDLDRAEELCRNLEKVRD EALKRGIDVRDLVSNACVIKVALELK (SEQ ID NO:109)
G1_neo2_40	H1->H4- >H2' - >H3	STKKLQLQAEHALLDAQMMLNRSPEPNEKLNRIITTMQSWISTGKIDLDGAKELAKEVEELRQ EAEKRGIDVRDLASNLKVIKVALELA (SEQ ID NO:18) STKKLQLQAEHALLDAQMMLNRSPEPNEKLNRIITTMQSWISTGKIDLDGAKELAKEVEELRQ EAEKRGIDVRDLASNLKVIKVALELA (SEQ ID NO:110)
G1_neo2_41	H1->H4- >H2' - >H3	STKKLQLQAEHALLDAQMMLNRSPEPNEKLNRIITTMQSCISTGKCDLDGAKELAKEVEELRQ EAEKRGIDVRDLASNLKVIKVALELA (SEQ ID NO:19) STKKLQLQAEHALLDAQMMLNRSPEPNEKLNRIITTMQSCISTGKCDLDGAKELAKEVEELRQ EAEKRGIDVRDLASNLKVIKVALELA (SEQ ID NO:111)
G1_neo2_42	H1->H4- >H2' - >H3	STKKIQLQLEHALLDVQMALNRSPEPNESLNRMITWLQSWISTGKIDLDNAQEMAKEAEKIRK EMEKRIGIDVRDLISNIIIVILLELS (SEQ ID NO:20) STKKIQLQLEHALLDVQMALNRSPEPNESLNRMITWLQSWISTGKIDLDNAQEMAKEAEKIRK EMEKRIGIDVRDLISNIIIVILLELS (SEQ ID NO:112)
G1_neo2_43	H1->H4- >H2' - >H3	STKKIQLQLEHALLDVQMALNRSPEPNESLNRMITWLQSCISTGKCDLDNAQEMAKEAEKIRK EMEKRIGIDVRDLISNIIIVILLELS (SEQ ID NO:21) STKKIQLQLEHALLDVQMALNRSPEPNESLNRMITWLQSCISTGKCDLDNAQEMAKEAEKIRK EMEKRIGIDVRDLISNIIIVILLELS (SEQ ID NO:113)
G1_neo2_44	H1->H4- >H2' - >H3	STKKIQLQLEHALLDVQMALNRSPEPNESLNRMITWLQSWISTGKIDLDNAQEMCKEAEKIRK EMEKRIGIDVRDLISNICVILLELS (SEQ ID NO:22) STKKIQLQLEHALLDVQMALNRSPEPNESLNRMITWLQSWISTGKIDLDNAQEMCKEAEKIRK EMEKRIGIDVRDLISNICVILLELS (SEQ ID NO:114)

G1_neo2_40_1A	H1->H4- >H2' - >H3	STKKTQLLAEHALLDAFMMLNVVPEPNEKLNRIITTMQSWIYTGKIDADGAKELAKEVEEELQE YEKRGIDVEDDASNLKVIKVALELA (SEQ ID NO:23) STKKTQLLAEHALLDAFMMLNVVPEPNEKLNRIITTMQSWIYTGKIDADGAKELAKEVEEELQE YEKRGIDVEDDASNLKVIKVALELA (SEQ ID NO:115)
G1_neo2_40_1B	H1->H4- >H2' - >H3	STKKTQLLAEHALLDAHMLNMLPEPNEKLNRIITTMQSWIHTGKIDGDGAQELAKEVEEELQE YEKRGIDVEDEASNLKVIKVALELA (SEQ ID NO:24) STKKTQLLAEHALLDAHMLNMLPEPNEKLNRIITTMQSWIHTGKIDGDGAQELAKEVEEELQE YEKRGIDVEDEASNLKVIKVALELA (SEQ ID NO:116)
G1_neo2_40_1C	H1->H4- >H2' - >H3	STKKTQLLAEHALLDAFMMLNMVPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDGAKELAKEVEEELQE FEKRGIDVEDEASNLKVIKVALELA (SEQ ID NO:25) STKKTQLLAEHALLDAFMMLNMVPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDGAKELAKEVEEELQE FEKRGIDVEDEASNLKVIKVALELA (SEQ ID NO:117)

G1_neo2_40_1D	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLLAEHALLDALMMLNMVPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQELAKEVEELEE LEKRGIDVEDYASNLKVILLELA (SEQ ID NO:26) STKKTQLLAEHALLDALMMLNMVPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQELAKEVEELEE LEKRGIDVEDYASNLKVILLELA (SEQ ID NO:118)
G1_neo2_40_1E	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLLAEHALLDAHMLNVMVPEPNEKLNRIITTMQSWIYTGKIDRDGAQELAKEVEELEE LEKRGIDVDDASNLKVILLELA (SEQ ID NO:27) STKKTQLLAEHALLDAHMLNVMVPEPNEKLNRIITTMQSWIYTGKIDRDGAQELAKEVEELEE LEKRGIDVDDASNLKVILLELA (SEQ ID NO:119)
G1_neo2_40_1F	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLLAEHALLDALMMLNLLPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQELAKEVEELEE HEKRGIDVEDYASNLKVILLELA (SEQ ID NO:28) STKKTQLLAEHALLDALMMLNLLPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQELAKEVEELEE HEKRGIDVEDYASNLKVILLELA (SEQ ID NO:120)
G1_neo2_40_1G	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLLAEHALLDAYMMLNMVPEPNEKLNRIITTMQSWILTGKIDSDGAQELAKEVEELEE LEKRGIDVDDASNLKVILLELA (SEQ ID NO:29) STKKTQLLAEHALLDAYMMLNMVPEPNEKLNRIITTMQSWILTGKIDSDGAQELAKEVEELEE LEKRGIDVDDASNLKVILLELA (SEQ ID NO:121)
G1_neo2_40_1H	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLLAEHALLDAYMMLNVMPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDGAKELAKEVEELEE FEKRGIDVDDASNLKVILLELA (SEQ ID NO:30) STKKTQLLAEHALLDAYMMLNVMPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDGAKELAKEVEELEE FEKRGIDVDDASNLKVILLELA (SEQ ID NO:122)
G1_neo2_40_1I	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLLAEHALLDAYMMLNLVPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDADGAQELAEVEELEE YEKRGIDVDDYASNLKVILLELA (SEQ ID NO:31) STKKTQLLAEHALLDAYMMLNLVPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDADGAQELAEVEELEE YEKRGIDVDDYASNLKVILLELA (SEQ ID NO:123)
G1_neo2_40_1J	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLMAEHALLDAFMMLNVLPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDDAQELAKEVEELEE LEKRGIDVDDASNLKVILLELA (SEQ ID NO:32) STKKTQLMAEHALLDAFMMLNVLPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDDAQELAKEVEELEE LEKRGIDVDDASNLKVILLELA (SEQ ID NO:124)
G1_neo2_40_1F_H1	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLLIEHALLDALDMSRNLPEPNEKLSRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQQLAKEVEELEE HEKRGEDVEDEASNLKVILLELA (SEQ ID NO:33) STKKTQLLIEHALLDALDMSRNLPEPNEKLSRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQQLAKEVEELEE HEKRGEDVEDEASNLKVILLELA (SEQ ID NO:125)
G1_neo2_40_1F_H2	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLLLEHALLDALHMRRNLPEPNEKLSRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQELAKEVEELEE HEKRGDVEDDASNLKVILLELA (SEQ ID NO:34) STKKTQLLLEHALLDALHMRRNLPEPNEKLSRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQELAKEVEELEE HEKRGDVEDDASNLKVILLELA (SEQ ID NO:126)
G1_neo2_40_1F_H3	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLLIEHALLDALNMRKKLPEPNEKLSRIITDMQSWIFTGKIDGDGAQQLAKEVEELEE HEKRGGDVEDYASNLKVILLELA (SEQ ID NO:35) STKKTQLLIEHALLDALNMRKKLPEPNEKLSRIITDMQSWIFTGKIDGDGAQQLAKEVEELEE HEKRGGDVEDYASNLKVILLELA (SEQ ID NO:127)
G1_neo2_40_1F_H4	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLLLEHALLDALHMSRELPEPNEKLNRIITDMQSWIFTGKIDGDGAQDLAKEVEELEE HEKRGGDVEDYASNLKVILLELA (SEQ ID NO:36) STKKTQLLLEHALLDALHMSRELPEPNEKLNRIITDMQSWIFTGKIDGDGAQDLAKEVEELEE HEKRGGDVEDYASNLKVILLELA (SEQ ID NO:128)
G1_neo2_40_1F_H5	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLLIEHALLDALHMSRKLPEPNEKLSRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQH LAKEVEELEE HEKRGGEVEDEASNLKVILLELA (SEQ ID NO:37) STKKTQLLIEHALLDALHMSRKLPEPNEKLSRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQH LAKEVEELEE HEKRGGEVEDEASNLKVILLELA (SEQ ID NO:129)
G1_neo2_40_1F_H6	H1->H4->H2'->H3	STKKTQLLIEHALLDALHMKRKLPEPNEKLNRIITNMQSWIFTEKIDGDGAQDLAKEVEELEE HEKRGQDVEDYASNLKVILLELA (SEQ ID NO:38) STKKTQLLIEHALLDALHMKRKLPEPNEKLNRIITNMQSWIFTEKIDGDGAQDLAKEVEELEE HEKRGQDVEDYASNLKVILLELA (SEQ ID NO:130)

G1_neo2_40_1F_M1	H1->H4->H2'->H3	ST <del>E</del> KTQLAAEHALRDALMLKHL <u>LN</u> EPNEKLARIITTMQSWQFTGKIDGDGAQELAKEVEEELQQE HEVRGIDVEDYASNLKVILLHLA (SEQ ID NO:39) ST <del>E</del> KTQLAAEHALRDALMLKHL <u>LN</u> EPNEKLARIITTMQSWQFTGKIDGDGAQELAKEVEEELQQE HEVRGIDVEDYASNLKVILLHLA (SEQ ID NO:131)
G1_neo2_40_1F_M2	H1->H4->H2'->H3	STKNTQLAAEDALLDALMLRN <u>LN</u> EPNEKLARIITTMQSWQFTEKIDGDGAQELAKEVEEELQQE HEERGIDVEDYASNLKVILLQLA (SEQ ID NO:40) STKNTQLAAEDALLDALMLRN <u>LN</u> EPNEKLARIITTMQSWQFTEKIDGDGAQELAKEVEEELQQE HEERGIDVEDYASNLKVILLQLA (SEQ ID NO:132)
G1_neo2_40_1F_M3	H1->H4->H2'->H3	ST <del>E</del> KTQHAEDALRDALMLRN <u>LN</u> EPNEKLARIITTMQSWQFTEKIDGDGAQELAKEVEEELQQE HEVRGIDVEDYASNLKVILLQLA (SEQ ID NO:41) ST <del>E</del> KTQHAEDALRDALMLRN <u>LN</u> EPNEKLARIITTMQSWQFTEKIDGDGAQELAKEVEEELQQE HEVRGIDVEDYASNLKVILLQLA (SEQ ID NO:133)

G2_neo2_40_1F_seq02	H1->H4->H2'->H3	TQKKQQLLAEHALLDALMILNMLKTSSEAVNRMITIAQSWIFTGTSNP <del>E</del> EAKEMIKMAEQAE <del>E</del> ARREGVDTEDYVSNLKVILKEIA (SEQ ID NO:42) TQKKQQLLAEHALLDALMILNMLKTSSEAVNRMITIAQSWIFTGTSNP <del>E</del> EAKEMIKMAEQAE <del>E</del> ARREGVDTEDYVSNLKVILKEIA (SEQ ID NO:134)
G2_neo2_40_1F_seq03	H1->H4->H2'->H3	TTK <del>K</del> YQLLVEHALLDALMMLNLSS <del>E</del> SN <del>E</del> KMNRIITTMQSWIFTGT <del>F</del> DPDQAEELAKLVEELREE FRKR <del>G</del> IDT <del>E</del> DYASNLKVILKELS (SEQ ID NO:43) TTK <del>K</del> YQLLVEHALLDALMMLNLSS <del>E</del> SN <del>E</del> KMNRIITTMQSWIFTGT <del>F</del> DPDQAEELAKLVEELREE FRKR <del>G</del> IDT <del>E</del> DYASNLKVILKELS (SEQ ID NO:135)
G2_neo2_40_1F_seq04	H1->H4->H2'->H3	TTK <del>K</del> IQLLVEHALLDALMILNLSS <del>E</del> SN <del>E</del> KLNRITTLQSWIFRGEIDPDRARELAKLLEEIREE MRKR <del>G</del> IDT <del>E</del> DYVSNMIVIIRELA (SEQ ID NO:44) TTK <del>K</del> IQLLVEHALLDALMILNLSS <del>E</del> SN <del>E</del> KLNRITTLQSWIFRGEIDPDRARELAKLLEEIREE MRKR <del>G</del> IDT <del>E</del> DYVSNMIVIIRELA (SEQ ID NO:136)
G2_neo2_40_1F_seq05	H1->H4->H2'->H3	T <del>K</del> KKIQLLAEHVLLDLLMMLNLSS <del>E</del> SN <del>E</del> KMNRLITIVQSWIFTGTIDPDQAEEMAKWVEELREE FRKR <del>G</del> IDT <del>E</del> DYASNVKILKELS (SEQ ID NO:45) T <del>K</del> KKIQLLAEHVLLDLLMMLNLSS <del>E</del> SN <del>E</del> KMNRLITIVQSWIFTGTIDPDQAEEMAKWVEELREE FRKR <del>G</del> IDT <del>E</del> DYASNVKILKELS (SEQ ID NO:137)
G2_neo2_40_1F_seq06	H1->H4->H2'->H3	TTK <del>K</del> YQLLIEHLLLDALMVLNMSSESN <del>E</del> KLNRITILQSWIFTGTWDPDLAEEMEKL <del>M</del> Q <del>E</del> IE <del>E</del> LRRR <del>G</del> IDT <del>E</del> DYMSNMRV <del>I</del> IKELS (SEQ ID NO:46) TTK <del>K</del> YQLLIEHLLLDALMVLNMSSESN <del>E</del> KLNRITILQSWIFTGTWDPDLAEEMEKL <del>M</del> Q <del>E</del> IE <del>E</del> LRRR <del>G</del> IDT <del>E</del> DYMSNMRV <del>I</del> IKELS (SEQ ID NO:138)
G2_neo2_40_1F_seq07	H1->H4->H2'->H3	T <del>K</del> KKLQLLVEHLLLDMLMILNMSSESN <del>E</del> KLNRILITELQSWIFRGEIDPDKAEEMWKIMEEIEKE LRER <del>G</del> IDT <del>E</del> DYMSNAKVI <del>I</del> IKELS (SEQ ID NO:47) T <del>K</del> KKLQLLVEHLLLDMLMILNMSSESN <del>E</del> KLNRILITELQSWIFRGEIDPDKAEEMWKIMEEIEKE LRER <del>G</del> IDT <del>E</del> DYMSNAKVI <del>I</del> IKELS (SEQ ID NO:139)
G2_neo2_40_1F_seq08	H1->H4->H2'->H3	TSKKQQLLAEHALLDALMILN <del>I</del> SS <del>E</del> SEAVNRAITWLQSWIFKGTVNP <del>D</del> QAEEMRKLAEQIREE MRKR <del>G</del> IDT <del>E</del> DYVSNLEVI <del>A</del> KELS (SEQ ID NO:48) TSKKQQLLAEHALLDALMILN <del>I</del> SS <del>E</del> SEAVNRAITWLQSWIFKGTVNP <del>D</del> QAEEMRKLAEQIREE MRKR <del>G</del> IDT <del>E</del> DYVSNLEVI <del>A</del> KELS (SEQ ID NO:140)
G2_neo2_40_1F_seq09	H1->H4->H2'->H3	TTK <del>K</del> YQLLIEHLLLDLLMVLNMSSESN <del>E</del> KINRLITWLQSWIFTGT <del>Y</del> DPDLAEEMYKILEELREE MRER <del>G</del> IDT <del>E</del> DYMSNMRV <del>I</del> VKELS (SEQ ID NO:49) TTK <del>K</del> YQLLIEHLLLDLLMVLNMSSESN <del>E</del> KINRLITWLQSWIFTGT <del>Y</del> DPDLAEEMYKILEELREE MRER <del>G</del> IDT <del>E</del> DYMSNMRV <del>I</del> VKELS (SEQ ID NO:141)
G2_neo2_40_1F_seq10	H1->H4->H2'->H3	TTK <del>K</del> KWQLLIEHLLLDLLMILNLSS <del>E</del> SN <del>E</del> KLNRILITWLQSWIFTGT <del>Y</del> DPDLAEEMK <del>K</del> MMDEIEDE LRER <del>G</del> IDT <del>E</del> DYMSNAKVI <del>I</del> IKELS (SEQ ID NO:50) TTK <del>K</del> KWQLLIEHLLLDLLMILNLSS <del>E</del> SN <del>E</del> KLNRILITWLQSWIFTGT <del>Y</del> DPDLAEEMK <del>K</del> MMDEIEDE LRER <del>G</del> IDT <del>E</del> DYMSNAKVI <del>I</del> IKELS (SEQ ID NO:142)
G2_neo2_40_1F_seq11	H1->H4->H2'->H3	T <del>K</del> KKIQLLVEHALLDALMILNLSS <del>E</del> SN <del>E</del> KLNRITTMQSWIFTGTIDPDQAEELS <del>K</del> LVEEIREE MRKR <del>G</del> IDT <del>E</del> DYVSNLKVILDELS (SEQ ID NO:51) T <del>K</del> KKIQLLVEHALLDALMILNLSS <del>E</del> SN <del>E</del> KLNRITTMQSWIFTGTIDPDQAEELS <del>K</del> LVEEIREE MRKR <del>G</del> IDT <del>E</del> DYVSNLKVILDELS (SEQ ID NO:143)

G2_neo2_40_1F_seq12	H1->H4->H2'->H3	TEKKLQLLVEHALLDALMILNLWSESNEKLNRIITTMQSWIFTGRIDPDKAEELAKLVEELREE ARERGITDTEYVSNLKVILKELS (SEQ ID NO:52) TEKKLQLLVEHALLDALMILNLWSESNEKLNRIITTMQSWIFTGRIDPDKAEELAKLVEELREE ARERGITDTEYVSNLKVILKELS (SEQ ID NO:144)
G2_neo2_40_1F_seq13	H1->H4->H2'->H3	TKKKYQLLMEHLLLDLLMVLNMSSESNEKLNRLITIIQSWIFTGTWDPDKAEEMAKMLKEIEDE LRERGITDTEYMSNMIVIMKELS (SEQ ID NO:53) TKKKYQLLMEHLLLDLLMVLNMSSESNEKLNRLITIIQSWIFTGTWDPDKAEEMAKMLKEIEDE LRERGITDTEYMSNMIVIMKELS (SEQ ID NO:145)
G2_neo2_40_1F_seq14	H1->H4->H2'->H3	TTKKIQLLVEHALLDALMLLNLSSESNEKMNRIITTMQSWIFEGRIDPDQAQELAKLVEELREE FRKRGIDTEYVSNLKVILEELS (SEQ ID NO:54) TTKKIQLLVEHALLDALMLLNLSSESNEKMNRIITTMQSWIFEGRIDPDQAQELAKLVEELREE FRKRGIDTEYVSNLKVILEELS (SEQ ID NO:146)
G2_neo2_40_1F_seq15	H1->H4->H2'->H3	TKKKIQLLVEHALLDALMMLNLSSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTIDPDQAEEELAKLVRELREE FRKRGIDTEYASNLEVILRELS (SEQ ID NO:55) TKKKIQLLVEHALLDALMMLNLSSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTIDPDQAEEELAKLVRELREE FRKRGIDTEYASNLEVILRELS (SEQ ID NO:147)
G2_neo2_40_1F_seq16	H1->H4->H2'->H3	TKKKIQLLVEHALLDALMILNLSSKSNEKLNRIITTMQSWIFNGTIDPDRARELAKLVEEIRDE MEKNGIDTEYVSNLKVILEELA (SEQ ID NO:56) TKKKIQLLVEHALLDALMILNLSSKSNEKLNRIITTMQSWIFNGTIDPDRARELAKLVEEIRDE MEKNGIDTEYVSNLKVILEELA (SEQ ID NO:148)
G2_neo2_40_1F_seq17	H1->H4->H2'->H3	TKKKYQLLIEHVLLDLLMLLNLSSESNEKMNRLITILQSWIFTGTYPDPAEEMAKLLKELREE FRERGITDTEYISNAIVILKELS (SEQ ID NO:57) TKKKYQLLIEHVLLDLLMLLNLSSESNEKMNRLITILQSWIFTGTYPDPAEEMAKLLKELREE FRERGITDTEYISNAIVILKELS (SEQ ID NO:149)
G2_neo2_40_1F_seq18	H1->H4->H2'->H3	TKKKIQLLVEHALLDALMMLNLSSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTIDPDRAEELAKLVEELREE FRKRGIDTEYASNLKVILKELS (SEQ ID NO:58) TKKKIQLLVEHALLDALMMLNLSSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTIDPDRAEELAKLVEELREE FRKRGIDTEYASNLKVILKELS (SEQ ID NO:150)
G2_neo2_40_1F_seq19	H1->H4->H2'->H3	TKKKIQLLVEHALLDALMMLNLSSESNEKLNRIITTMQSWIFNGTIDPDQARELAKLVEELREE FRKRGIDTEYASNLKVILEELA (SEQ ID NO:59) TKKKIQLLVEHALLDALMMLNLSSESNEKLNRIITTMQSWIFNGTIDPDQARELAKLVEELREE FRKRGIDTEYASNLKVILEELA (SEQ ID NO:151)
G2_neo2_40_1F_seq20	H1->H4->H2'->H3	TKKKLQLLVEHALLDALMLLNLSSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTVDPDQAEEELAKLVEEIREE LRKRGIDTEYVSNLKVILKELS (SEQ ID NO:60) TKKKLQLLVEHALLDALMLLNLSSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTVDPDQAEEELAKLVEEIREE LRKRGIDTEYVSNLKVILKELS (SEQ ID NO:152)
G2_neo2_40_1F_seq21	H1->H4->H2'->H3	TTKKYQLLVEHALLDALMILNLSSSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTDFDPQAEEELAKLVREIREE MRKRGIDTEYVSNLEVILRELS (SEQ ID NO:61) TTKKYQLLVEHALLDALMILNLSSSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTDFDPQAEEELAKLVREIREE MRKRGIDTEYVSNLEVILRELS (SEQ ID NO:153)
G2_neo2_40_1F_seq22	H1->H4->H2'->H3	TKKKIQLLVEHALLDALMILNLSSSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTIDPDRAEELAKLVREIREE MRKRGIDTEYVSNLEVILRELS (SEQ ID NO:62) TKKKIQLLVEHALLDALMILNLSSSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTIDPDRAEELAKLVREIREE MRKRGIDTEYVSNLEVILRELS (SEQ ID NO:154)
G2_neo2_40_1F_seq23	H1->H4->H2'->H3	TKKKYQLLIEHLLLDLLMILNLSSSESNEKLNRLITWLQSWIFRGEWDPDKAEWAKILKEIREE LRERGITDTEYMSNAIVIMKELS (SEQ ID NO:63) TKKKYQLLIEHLLLDLLMILNLSSSESNEKLNRLITWLQSWIFRGEWDPDKAEWAKILKEIREE LRERGITDTEYMSNAIVIMKELS (SEQ ID NO:155)
G2_neo2_40_1F_seq24	H1->H4->H2'->H3	TDKKLQLLVEHLLLDLLMMLNLSKSNEKMNRLITIAQSWIFTGKVDPDLAREMIKLEETEDE NRKNGIDTEYVSNARVIAKELE (SEQ ID NO:64) TDKKLQLLVEHLLLDLLMMLNLSKSNEKMNRLITIAQSWIFTGKVDPDLAREMIKLEETEDE NRKNGIDTEYVSNARVIAKELE (SEQ ID NO:156)

G2_neo2_40_1F_seq25	H1->H4->H2'->H3	TKKKIQLLVEHALLDALMLLNLSSESNEKMNRIITTMQSWIFTGTIDPDQAEELAKLVEELKEE FKKRGIDTETYVSNLKVILKELS (SEQ ID NO:65) TKKKIQLLVEHALLDALMLLNLSSESNEKMNRIITTMQSWIFTGTIDPDQAEELAKLVEELKEE FKKRGIDTETYVSNLKVILKELS (SEQ ID NO:157)
G2_neo2_40_1F_seq26	H1->H4->H2'->H3	TKKKYQLLIEHALLDALMILNLWSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTYPDPAEELKLAKEIEDE ARERGITDETYMSNLRVILKELS (SEQ ID NO:66) TKKKYQLLIEHALLDALMILNLWSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTYPDPAEELKLAKEIEDE ARERGITDETYMSNLRVILKELS (SEQ ID NO:158)
G2_neo2_40_1F_seq27	H1->H4->H2'->H3	TKKKAQLLAEHALLDALMLLNLSSESNERLNRIITWLQSIIFTGTYPDPMVKEAVKLADEIEDE MRKRGIDTETYVSNLRVILQELA (SEQ ID NO:67) TKKKAQLLAEHALLDALMLLNLSSESNERLNRIITWLQSIIFTGTYPDPMVKEAVKLADEIEDE MRKRGIDTETYVSNLRVILQELA (SEQ ID NO:159)
G2_neo2_40_1F_seq28	H1->H4->H2'->H3	TQKKNQLLAEHLLLDALMVLNQSSSESSEVANRIITWAQSWIFEGRVDPNKAAEEAKKLAKKLEEE MRKRGIDMEDYISNMKVIAEEMS (SEQ ID NO:68) TQKKNQLLAEHLLLDALMVLNQSSSESSEVANRIITWAQSWIFEGRVDPNKAAEEAKKLAKKLEEE MRKRGIDMEDYISNMKVIAEEMS (SEQ ID NO:160)
G2_neo2_40_1F_seq29	H3->H2'->H4->H1	EDYYSNLKVIILEELAREMERNGLSDKAEWRQWKKIVERIRQIRSNNSDLNEAKELLNRLITYI QSQIFEISERIRETDQEKKEESWKKWQLLLEHALLDVLMLLND (SEQ ID NO:69) EDYYSNLKVIILEELAREMERNGLSDKAEWRQWKKIVERIRQIRSNNSDLNEAKELLNRLITYI QSQIFEISERIRETDQEKKEESWKKWQLLLEHALLDVLMLLND (SEQ ID NO:161)
G2_neo2_40_1F_seq30	H1->H3->H2'->H4	PEKKRQLLLEHILLDALMLLNLXXXXXXNTESKFEDIYISNAEVIABEELAKLMESXXXLSDEAEKF KKIKQWLREVWRIWXXXXWSTLEDKARELLNRIITTIQSQIFY (SEQ ID NO:70) PEKKRQLLLEHILLDALMLLNLLETNPQNTESKFEDIYISNAEVIABEELAKLMESLGLSDEAEKF KKIKQWLREVWRIWSSTNWSTLEDKARELLNRIITTIQSQIFY (SEQ ID NO:162)
G2_neo2_40_1F_seq31	H1->H3->H2'->H4	PEKKRQLLLEHILLDLLMILNMXXXXXXNTESEMEDIYWSNVRVILRELARLMEEXXXKELSELM ERMRKIVEKIRQIVTXXXXLDTAREWLNRLITWIQSLIFR (SEQ ID NO:71) PEKKRQLLLEHILLDLLMILNMIETNRENTESEMEDIYWSNVRVILRELARLMEELNYKELSELM ERMRKIVEKIRQIVTNNSSLDTAREWLNRLITWIQSLIFR (SEQ ID NO:163)
G2_neo2_40_1F_seq32	H1->H3->H2'->H4	PEKKRQLLAEHALLDALMLLNIIETNSKNTESKMEDYVSNLEVILTEFKKLAEKLNFSSEEAERA ERMKRWARKAYQMMTLDLSLSDKAKEMLNRIITILQSIIFN (SEQ ID NO:72) PEKKRQLLAEHALLDALMLLNIIETNSKNTESKMEDYVSNLEVILTEFKKLAEKLNFSSEEAERA ERMKRWARKAYQMMTLDLSLSDKAKEMLNRIITILQSIIFN (SEQ ID NO:164)
G2_neo2_40_1F_seq33	H1->H3->H2'->H4	PEKKRQLLAEHLLLDVLMMLNGNASLKDYASNAQVIADDEFRELARELGLTDEAKKAEKIEALE RAREWLLNNKDKEKAKEALNRAITIAQSWIFN (SEQ ID NO:73) PEKKRQLLAEHLLLDVLMMLNGNASLKDYASNAQVIADDEFRELARELGLTDEAKKAEKIEALE RAREWLLNNKDKEKAKEALNRAITIAQSWIFN (SEQ ID NO:165)
G2_neo2_40_1F_seq34	H1->H3->H2'->H4	PEKKRQLLLEHLLLDLLMILNMLRTNPKNIESDWEDYMSNIEVIEELRKIMESLGRSEKAKEW KRMKQWVRRIEIVKNNSDLEEAKEWLNRLITIVQSEIFE (SEQ ID NO:74) PEKKRQLLLEHLLLDLLMILNMLRTNPKNIESDWEDYMSNIEVIEELRKIMESLGRSEKAKEW KRMKQWVRRIEIVKNNSDLEEAKEWLNRLITIVQSEIFE (SEQ ID NO:166)
G2_neo2_40_1F_seq35	H1->H3->H2'->H4	WEKKRQLLLEHLLLDLLMILNMWRTNPQNTESLMEDIYMSNAKVIIEELARMMRSQGLDQKAREW EEMKKRIEIRQIIQNSSKERAKEELNRLITYVQSEIFR (SEQ ID NO:75) WEKKRQLLLEHLLLDLLMILNMWRTNPQNTESLMEDIYMSNAKVIIEELARMMRSQGLDQKAREW EEMKKRIEIRQIIQNSSKERAKEELNRLITYVQSEIFR (SEQ ID NO:167)
G2_neo2_40_1F_seq36	H1->H3->H2'->H4	PKKKIQLLAEHALLDALMILNIVKTNNSQNAEKELEDYASNVEVILEEIIARLMESGDQKDEAEKA KRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANRIITLLQSWIFS (SEQ ID NO:76) PKKKIQLLAEHALLDALMILNIVKTNNSQNAEKELEDYASNVEVILEEIIARLMESGDQKDEAEKA KRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANRIITLLQSWIFS (SEQ ID NO:168)
G2_neo2_40_1F_seq37	H1->H3->H2'->H4	PEKKRQLLAEHALLDALMILNXXXXXXQNAEKELEDYMSNVEVIMEEFARMMRXXXXSEEAENA ERIKKWVRKASSXXXSEEQREMMNRAITLMQSWIFE (SEQ ID NO:77)

		PEKKRQLLAEHALLDALMILNLIQTNPQNAEEKLEDYMSNVEVIMEEFARMMRNGDRSEEAENA ERIKKWVRKASSTASSEEQREMMNRAITLMQSWIFE (SEQ ID NO:169)
G2_neo2_40_1F_seq38	H1->H3->H2'->H4	PEKKRQLLAEHLLLDALMVLNMXXXXXXNTEEKLEDYISNMKVIKEMIELMRS�XXXEEAEKW KEALKAVEKIXXXXDSETARELANRIITLAQSAIFY (SEQ ID NO:78)  PEKKRQLLAEHLLLDALMVLNMLTTNSKNTEEKLEDYISNMKVIKEMIELMRS�GRLEEEAEKW KEALKAVEKIGSRMDSETARELANRIITLAQSAIFY (SEQ ID NO:170)
G2_neo2_40_1F_seq39	H1->H3->H2'->H4	PEKKRQLLAEHALLDALMFLNLNXXXXXXQAEKIEDYASNLRVIAEELARLFENLXXXDEAQKA KDIKELAERARSXXSSEKRKEAMNRAITILQSMIFR (SEQ ID NO:79)  PEKKRQLLAEHALLDALMFLNLVETNPDQAEKIEDYASNLRVIAEELARLFENLGRLDDEAQKA KDIKELAERARSRVSSSEKRKEAMNRAITILQSMIFR (SEQ ID NO:171)
G2_neo2_40_1F_seq40	H1->H3->H2'->H4	PEKKRQLLAEHALLDALMILNIIIRTNSDNTESKLEDYISNLKVILEEIARLMESLGLSDEAEKA KEAMRLADKAGSTASEEEEKKEAMNRVITWAQSWIFN (SEQ ID NO:80)  PEKKRQLLAEHALLDALMILNIIIRTNSDNTESKLEDYISNLKVILEEIARLMESLGLSDEAEKA KEAMRLADKAGSTASEEEEKKEAMNRVITWAQSWIFN (SEQ ID NO:172)
G2_neo2_40_1F_seq41	H1->H3->H2'->H4	PEKKRQLLAEHALLDALMMLNIIIRTNPDAEEKLEDYWSNLIVILREIAKLMESLGLTDEAEKA KEARWAEARTTASQDORRELANRIITLLQSWIFS (SEQ ID NO:81)  PEKKRQLLAEHALLDALMMLNIIIRTNPDAEEKLEDYWSNLIVILREIAKLMESLGLTDEAEKA KEARWAEARTTASQDORRELANRIITLLQSWIFS (SEQ ID NO:173)
G2_neo2_40_1F_seq42	H1->H3->H2'->H4	PEKKRQLLAEHLLLDALMILNIIETNEQNAESKLEDYISNAKVIILDEFREMARDLGLLDEAKKA EKMRWLEKMRSNASSDERREWANRMITTAQSWIFN (SEQ ID NO:82)  PEKKRQLLAEHLLLDALMILNIIETNEQNAESKLEDYISNAKVIILDEFREMARDLGLLDEAKKA EKMRWLEKMRSNASSDERREWANRMITTAQSWIFN (SEQ ID NO:174)

G2_neo2_40_1F_seq27_S3	H1->H4->H2'->H3	TNKAQLHAEFALHDALMLLNLSSESNERLNRIITWLQSIIFYGTYPDMVKEAVKDADEIEDE MRKRKIDTETYVSNLRLILQELA (SEQ ID NO:83)  TNKAQLHAEFALHDALMLLNLSSESNERLNRIITWLQSIIFYGTYPDMVKEAVKDADEIEDE MRKRKIDTETYVSNLRLILQELA (SEQ ID NO:245)
G2_neo2_40_1F_seq27_S18	H1->H4->H2'->H3	TNKAQLHAEFALYDALMLLNLSSESNERLNRIITWLQSIIFYETYDPDMVKEAVKLADEIEDE MRKRKIDTETYVVNLRILILQELA (SEQ ID NO:84)  TNKAQLHAEFALYDALMLLNLSSESNERLNRIITWLQSIIFYETYDPDMVKEAVKLADEIEDE MRKRKIDTETYVVNLRILILQELA (SEQ ID NO:175)
G2_neo2_40_1F_seq27_S22	H1->H4->H2'->H3	TKKDAELLAEFALYDALMLLNLSSESNERLNEIITWLQSIIFYGTYPDMVKEAVKLADEIEDE MRKRKIDTETYVSNLRLILQELA (SEQ ID NO:85)  TKKDAELLAEFALYDALMLLNLSSESNERLNEIITWLQSIIFYGTYPDMVKEAVKLADEIEDE MRKRKIDTETYVSNLRLILQELA (SEQ ID NO:176)
G2_neo2_40_1F_seq27_S24	H1->H4->H2'->H3	TNKAQLHAEFALYDALMLLNLSSESNERLNNDIITWLQSIIFTGTYPDMVKEAVKLADEIEDE MRKRKIDTETYVVNLRILILQELA (SEQ ID NO:86)  TNKAQLHAEFALYDALMLLNLSSESNERLNNDIITWLQSIIFTGTYPDMVKEAVKLADEIEDE MRKRKIDTETYVVNLRILILQELA (SEQ ID NO:177)
G2_neo2_40_1F_seq29_S6	H3->H2'->H4->H1	EDYYSNLKLIILEELAREMERNGLSDKAEWRQWKKIVERIRQIRSNNSDLNEAKELNRLITYI QSQIFEVLHGGETDQEKKEESWKKWDLLEHALLDVLMLLND (SEQ ID NO:87)  EDYYSNLKLIILEELAREMERNGLSDKAEWRQWKKIVERIRQIRSNNSDLNEAKELNRLITYI QSQIFEVLHGGETDQEKKEESWKKWDLLEHALLDVLMLLND (SEQ ID NO:178)
G2_neo2_40_1F_seq29_S7	H3->H2'->H4->H1	EDYYSNLKVIILEELAREMERNGLSDKAEWRQWKKIVERIRQIRSNNSDLNEAKELNELITYI QSQIFEVIEREGETDQEKKEESWKKWELHLEHALLDVLMLLND (SEQ ID NO:88)  EDYYSNLKVIILEELAREMERNGLSDKAEWRQWKKIVERIRQIRSNNSDLNEAKELNELITYI QSQIFEVIEREGETDQEKKEESWKKWELHLEHALLDVLMLLND (SEQ ID NO:179)
G2_neo2_40_1F_seq29_S8	H3->H2'->H4->H1	EDYYSNLKLIILEELAREMERNGLSDKAEWRQWKKIVERIRQIRSNNSDLNEAKELNRLITYI QSQIFEVLEGGVGETDQEKKEESWKKWELHLEHALLDVLMLLND (SEQ ID NO:89)  EDYYSNLKLIILEELAREMERNGLSDKAEWRQWKKIVERIRQIRSNNSDLNEAKELNRLITYI QSQIFEVLEGGVGETDQEKKEESWKKWELHLEHALLDVLMLLND (SEQ ID NO:180)

Неолейкин-2/15 (т. е. G2_neo2_40_1F_seq36_S11)	H1->H3->H2'->H4	PKKKIQLHAEHALYDALMILNIVKTNSPPAEEKLEDYAFNFELILEEIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:90, вариант 1) PKKKIQLHAEHALYDALMILNIVKTNSPPAEEKLEDYAFNFELILEEIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:90, вариант 2) PKKKIQLHAEHALYDALMILNIVKTNSPPAEEKLEDYAFNFELILEEIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:181)
G2_neo2_40_1F_seq36_S12	H1->H3->H2'->H4	PKKKIQLLAEHALFDLLMILNIVKTN SQNAEEKLEDYAYNAGVILEEIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKDTASEDEQEEMANEIITILQSWNFS (SEQ ID NO:91) PKKKIQLLAEHALFDLLMILNIVKTN SQNAEEKLEDYAYNAGVILEEIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKDTASEDEQEEMANEIITILQSWNFS (SEQ ID NO:182)
Неолейкин-2/15-Н8У-К33Е	H1->H3->H2'->H4	PKKKIQLYAEHALYDALMILNIVKTN SPPEEELEDYAFNFELILEEIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:94) PKKKIQLYAEHALYDALMILNIVKTN SPPEEELEDYAFNFELILEEIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:246)
Неолейкин-2/15 (В этой показанной последовательности К32 считается остатком необязательного линкера)	H1->H3->H2'->H4	PKKKIQLHAEHALYDALMILNIVKTN SPPEEKLEDYAFNFELILEEIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:247)

IL4_G2_neo2_40_1F_seq36_S11	PKKKIQITAEAEALKDALSILNIVKTN SPPEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:92) PKKKIQITAEAEALKDALSILNIVKTN SPPEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:183)
Неолейкин-4 (то есть IL4_G2_neo2_40_1F_seq36_S11_MIF)	PKKKIQIMAEAEALKDALSILNIVKTN SPPEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMIEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:93) PKKKIQIMAEAEALKDALSILNIVKTN SPPEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMIEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:184)
Неолейкин-2/15_R50C	PKKKIQLHAEHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIARLFESGXXXKDEAEKAKRMKEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:275)
Неолейкин-2/15_E53C	PKKKIQLHAEHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIARLFESGXXXKDEAEKAKRMKEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:276)
Неолейкин-2/15_D56C	PKKKIQLHAEHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIARLFESGXCQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:277)
Неолейкин-2/15_K58C	PKKKIQLHAEHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIARLFESGXXXCDEAEKAKRMKEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:278)
Неолейкин-2/15_D59C	PKKKIQLHAEHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIARLFESGXXXKCEAEKAKRMKEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:279)
Неолейкин-2/15_E62C	PKKKIQLHAEHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIARLFESGXXXKDEACKAKRMKEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:280)

Неолейкин- 2/15_R66C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGXXXKDEAEK AKCMKEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:281)
Неолейкин- 2/15_E69C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGXXXKDEAEK AKRMKCWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:282)
Неолейкин- 2/15_R73C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGXXXKDEAEK AKRMKEWMKCIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:283)
Неолейкин- 2/15_T77C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGXXXKDEAEK AKRMKEWMKRIKTCASEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:284)
Неолейкин- 2/15_E82C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGXXXKDEAEK AKRMKEWMKRIKTXXXEDCQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:285)
Неолейкин- 2/15_E85C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGXXXKDEAEK AKRMKEWMKRIKTXXXEDEQECMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:286)
Неолейкин- 2/15_R50C_R73 C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИACLFESGXXXKDEAEK AKRMKEWMKCIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:287)
Неолейкин- 2/15_E53C_R73 C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFC_SGXXXKDEAEK AKRMKEWMKCIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:288)
Неолейкин- 2/15_D56C_R73 C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGC_QKDEAEK AKRMKEWMKCIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:289)
Неолейкин- 2/15_K58C_R73 C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGXXXCDEAEK AKRMKEWMKCIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:290)
Неолейкин- 2/15_D59C_R73 C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGXXXKCEAEK AKRMKEWMKCIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:291)
Неолейкин- 2/15_R66C_R73 C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGXXXKDEAEK AKCMKEWMKCIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:292)
Неолейкин- 2/15_R50C_E82 C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИACLFESGXXXKDEAEK AKRMKEWMKRIKTXXXEDCQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:293)
Неолейкин- 2/15_E53C_E82 C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFC_SGXXXKDEAEK AKRMKEWMKRIKTXXXEDCQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:294)
Неолейкин- 2/15_D56C_E82 C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGC_QKDEAEK AKRMKEWMKRIKTXXXEDCQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:295)
Неолейкин- 2/15_K58C_E82 C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGXXXCDEAEK AKRMKEWMKRIKTXXXEDCQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:296)
Неолейкин- 2/15_D59C_E82 C	PKKKIQLHAЕHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEИARLFESGXXXKCEAEK AKRMKEWMKRIKTXXXEDCQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:297)

Неолейкин- 2/15_Е62С_Е82 С	PKKKIQ <del>L</del> HAENALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFE <del>L</del> I <del>L</del> E <del>E</del> IARLFESG <del>XX</del> KDEACK AKRMKEWMKRIKT <del>XXX</del> EDCQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:298)
Неолейкин- 2/15_Р66С_Е82 С	PKKKIQ <del>L</del> HAENALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFE <del>L</del> I <del>L</del> E <del>E</del> IARLFESG <del>XX</del> KDEAEK AKCMKEWMKRIKT <del>XXX</del> EDCQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:299)
Неолейкин- 2/15_Е69С_Е82 С	PKKKIQ <del>L</del> HAENALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFE <del>L</del> I <del>L</del> E <del>E</del> IARLFESG <del>XX</del> KDEAEK AKRMKC <del>W</del> MKRIKT <del>XXX</del> EDCQEEMANAIITILQSWIFS* (SEQ ID NO:300)

Согласно конкретному варианту реализации X1, X2, X3 и X4, соответственно, на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентичны, соответственно, доменам X1, X2, X3 и X4 (определенным в

5 Таблице 1 (при этом они перечислены как домены H1, H2, H3 и H4), присутствующим в аминокислотной последовательности варианта 1 или 2 SEQ ID NO:90, которые имеют одинаковую первичную аминокислотную последовательность, но незначительно отличаются необязательными/вариабельными линкерными остатками. Согласно различным вариантам реализации данный вариант реализации может включать варианты

10 доменов X1, X2, X3 и/или X4, присутствующих в варианте 1 или 2 SEQ ID NO:90, которые включают мутации относительно первичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:90, показанные в SEQ ID NO:275-300.

В одном из вариантов реализации любого из вариантов реализации или комбинации вариантов реализации, раскрытых в настоящем документе, X1, X2, X3 и X4

15 представляют собой альфа-спиральные домены. В еще одном варианте реализации длина каждого из X1, X2, X3 и X4 независимо составляет по меньшей мере приблизительно 8, 10, 12, 14, 16, 19 или более аминокислот в длину. Согласно другим вариантам реализации длина каждого из X1, X2, X3 и X4 независимо не превышает 1000, 500, 400, 300, 200, 100 или 50 аминокислот в длину. Согласно различным дополнительным вариантам

20 реализации длина каждого из X1, X2, X3 и X4 независимо составляет приблизительно 8-1000, 8-500, 8-400, 8-300, 8-200, 8-100, 8-50, 10-1000, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 12-1000, 12-500, 12-400, 12-300, 12-200, 12-100, 12-50, 14-1000, 14-500, 14-400, 14-300, 14-200, 14-100, 14-50, 16-1000, 16-500, 16-400, 16-300, 16-200, 16-100, 16-50, 19-1000, 19-500, 19-400, 19-300, 19-200, 19-100 или приблизительно 19-50 аминокислот в

25 длину.

Согласно одному варианту реализации первый полипептидный компонент и/или второй полипептидный компонент содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь.

Согласно другому варианту реализации первый полипептидный компонент и второй полипептидный компонент нековалентно ассоциированы. Как отмечено в настоящей заявке, первый полипептидный компонент и второй полипептидный компонент не являются активными агонистами рецептора по отдельности, и при этом

5    указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептид взаимодействуют с образованием активного агониста гетеродимера  $\beta_c$  рецептора IL-2 (IL-2R $\beta_c$ ), гетеродимера  $\alpha_c$  рецептора IL-4 (IL-4R $\alpha_c$ ), IL-13 альфа или гетеродимера IL-4Ральфа/IL13Ральфа. Таким образом, в данном варианте реализации первый полипептид и второй полипептид могут взаимодействовать с образованием активного агониста. Это

10    взаимодействие может представлять собой любое подходящее взаимодействие, такое как нековалентное взаимодействие. Взаимодействие может включать непосредственное нековалентное связывание первого и второго полипептидов или опосредованное взаимодействие. Согласно одному варианту реализации первый полипептидный компонент и второй полипептидный компонент опосредовано связаны друг с другом

15    рецептором, такого как гетеродимер  $\beta_c$  рецептора IL-2 (IL-2R $\beta_c$ ), гетеродимер  $\alpha_c$  рецептора IL-4 (IL-4R $\alpha_c$ ), IL-13 альфа или гетеродимер IL-4Ральфа/IL13Ральфа.

Способы определения связывания с рецепторами известны в данной области техники и описаны в настоящей заявке, например, анализы связывания методом интерферометрии биослоя. Согласно некоторым вариантам реализации, когда первый

20    полипептидный компонент и второй полипептид взаимодействуют на своем предполагаемом рецепторе, они совместно локализуются для связывания с этим рецептором с аффинностью связывания 1000 нМ или менее, 200 нМ или менее, 100 нМ или менее, 50 нМ или менее или 25 нМ или менее. Например, расщепленный миметик IL-2 согласно настоящему изобретению будет совместно локализоваться для связывания с

25    гетеродимером  $\beta_c$  рецептора IL-2а (IL-2R $\beta_c$ ) с аффинностью связывания 1000 нМ или менее, 200 нМ или менее, 100 нМ или менее, 50 нМ или менее или 25 нМ или менее. Аналогичным образом, в качестве примера, расщепленный миметик IL-4 согласно настоящему изобретению будет совместно локализоваться для связывания с

30    гетеродимером  $\alpha_c$  рецептора IL-4 (IL-4R $\alpha_c$ ) с аффинностью связывания 1000 нМ или менее, 200 нМ или менее, 100 нМ или менее, 50 нМ или менее или 25 нМ или менее. Согласно некоторым аспектам агонизм рецептора, с которым совместно локализуются и связываются расщепленные миметики, измеряют по фосфорилированию STAT5.

Согласно другому аспекту настоящего раскрытия предложены полипептиды,

35    содержащие 1, 2 или 3, но не все 4 домена X1, X2, X3 и X4, причем:

a) X1, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI); (SEQ ID NO:4);

5 (b) X2, когда он присутствует, представляет собой любой спиральный пептидный домен;

(c) X3, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична 10 полной длине пептида (LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5); и

(d) X4, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична 15 полной длине пептида (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6); и аминокислотные остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать.

Полипептиды согласно данному аспекту можно применять, например, для создания условно активных агонистов рецептора согласно любому варианту реализации или комбинации вариантов реализации, раскрытых в настоящей заявке (то есть: полипептиды согласно данному аспекту представляют собой как первый полипептид, так 20 и второй полипептид условно активных агонистов рецептора согласно настоящему раскрытию). Таким образом, как будет ясно специалистам в данной области техники, все варианты реализации и комбинации вариантов реализации первого и второго полипептидов, раскрытых выше, все варианты реализации и комбинации вариантов реализации доменов X1, X2, X3 и X4, описанных выше, одинаково применимы к 25 полипептидам согласно данному аспекту настоящего раскрытия. Согласно одному варианту реализации

a) аминокислотные (АК) замены в X1 относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4 присутствуют не более чем в 3 остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 2 остатках аминокислот, 30 выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 1 остатке аминокислоты, выделенном жирным шрифтом, или не присутствуют в остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом;

(b) аминокислотные замены в X3 относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 присутствуют не более чем в 3 остатках аминокислот, 35 выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 2 остатках аминокислот,

выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 1 остатке аминокислоты, выделенном жирным шрифтом, или не присутствуют в остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом; и/или

- (с) аминокислотные замены в X4 относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6 присутствуют не более чем в 2 остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 1 остатке аминокислоты, выделенном жирным шрифтом, или не присутствуют в остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом.

- Согласно другому варианту реализации аминокислотные замены в X2 относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 не присутствуют в остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом.

Согласно различным вариантам реализации полипептид может быть выбран из группы, состоящей из:

- (i) полипептида, содержащего X1 и не содержащего X2, X3 и X4;
- (ii) полипептида, содержащего X2 и не содержащего X1, X3 и X4;
- (iii) полипептида, содержащего X3 и не содержащего X1, X2 и X4;
- (iv) полипептида, содержащего X4 и не содержащего X1, X2 и X3;
- (v) полипептида, содержащего X1 и X2 и не содержащего X3 и X4;
- (vi) полипептида, содержащего X1 и X3 и не содержащего X2 и X4;
- (vii) полипептида, содержащего X1 и X4 и не содержащего X2 и X3;
- (viii) полипептида, содержащего X2 и X3 и не содержащего X1 и X4;
- (ix) полипептида, содержащего X2 и X4 и не содержащего X1 и X3;
- (x) полипептида, содержащего X3 и X4 и не содержащего X1 и X2;
- (xi) полипептида, содержащего X1, X2 и X3 и не содержащего X4;
- (xii) полипептида, содержащего X1, X2 и X4 и не содержащего X3;
- (xiii) полипептида, содержащего X1, X3 и X4 и не содержащего X2; и
- (xiv) полипептида, содержащего X2, X3 и X4 и не содержащего X1.

- Согласно одному варианту реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична первому полипептиду или второму полипептиду, перечисленным ниже (подчеркнутые остатки являются необязательными, и каждый необязательный остаток, когда он присутствует, может содержать любую аминокислоту):

- (i)

Первый полипептид X1 (Neo2A) PKKKIQLHAENHALYDALMILNIVKTNS (SEQ ID NO:256) и

Второй полипептид: X3-X2'-X4 (Neo2B)

TNSPPAEKLEDYAFNFELILEEIIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITIL

5 QSWIFS (SEQ ID NO:257)

(ii)

Первый полипептид X1-X3-X2'

PKKKIQLHAENHALYDALMILNIVKTNSPPAEKLEDYAFNFELILEEIIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEW

10 MKRIKTTAS (SEQ ID NO:258) и

Второй полипептид X4 TTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:259);

(iii)

Первый полипептид X1-X3

15 PKKKIQLHAENHALYDALMILNIVKTNSPPAEKLEDYAFNFELILEEIIARLFESGD (SEQ ID NO:260) и

Второй полипептид X2-X4 DQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:261)

20 (iv)

Первый полипептид X1 (Neo4A) PKKKIQIMAEALKDALSILNIVKTNS (SEQ ID NO:262)

Второй полипептид X3-X2'-X4 (Neo4B)

25 TNSPPAEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMIEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITIL  
QSWFFS (SEQ ID NO:263)

(v)

Первый полипептид X1 (Neo2A) PKKKIQLHAENHALYDALMILNIXXXXXX (SEQ ID NO:311) и

30 Второй полипептид: X3-X2'-X4 (Neo2B)

XXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIIARLFESGXKDEAEKAKRMKEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITIL  
QSWIFS (SEQ ID NO:264)

35 (vi)

Первый полипептид X1-X3-X2'

PKKKIQLHAENHALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIIARLFESGXKDEAEKAKRMKEW

MKRIKTTAS (SEQ ID NO:265) и

Второй полипептид X4 XXXXXDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:266);

(vii)

Первый полипептид X1-X3

PKKKIQLHAENALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIIARLFESXXXGD (SEQ ID

5 NO:267) и

Второй полипептид X2-X4 DQKDEAEKAKRMKEWWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS

(SEQ ID NO:268)

(viii)

10 Первый полипептид X1 (Neo4A) PKKKIQIMAEELKDALSIILNIXXXXX (SEQ ID  
NO:269)

Второй полипептид X3-X2'-X4 (Neo4B)

XXXXXXXXQLERFAKRFERNLWGIARLFESGXXKDEAEKAKRMIEWWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITIL

15 QSWFFS (SEQ ID NO:270)

(ix)

Первый полипептид &gt;Neo4\_H1-H3'

PKKKIQIMAEELKDALSIILNIVKTNSPPAEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGD (SEQ ID  
20 NO:312)

Второй полипептид &gt;Neo4\_H2-H4

DQKDEAEKAKRMIEWWMKRIKTASEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:313)

(x)

Первый полипептид &gt;Neo4\_H1-H3'

25 PKKKIQIMAEELKDALSIILNIXXXXXXXXXXXQLERFAKRFERNLWGIARLFESXX (SEQ ID  
NO:314)

Второй полипептид &gt;Neo4\_H2-H4

XXKDEAEKAKRMIEWWMKRIKXXXXEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:315)

(xi)

30 Первый полипептид Neo4\_H1-H3'-H2

PKKKIQIMAEELKDALSIILNIVKTNSPPAEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMIEW  
MKRIKTTA (SEQ ID NO:316)

Второй полипептид Neo4\_H4

TTASEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:317)

(xii)

Первый полипептид Neo4\_H1-H3'-H2

5 PKKKIQIMAEELKDALSINXXXXXXXXXXXXLRFKRFERNLWGIARLFESXXXKDEAEKAKRMIEW  
MKRIKXXX (SEQ ID NO:318)

Второй полипептид Neo4\_H4

XXXXXDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:319);

(xiii)

10 Первый полипептид (X1)

PKKKIQLHAENALYDALMILNIVGGSS (SEQ ID NO:323), или

SKEAIQLHAENALYDALMILNIVKTNS (SEQ ID NO:324), или

PIQLHAENALYDALMILNIV (SEQ ID NO:325)

Второй полипептид (X3-X2' -

15 X4) PKLEDYAFNFELILEEIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSW  
IFS (SEQ ID NO:326); или

GGSSGGLEDYAFNFELILEEIARLFESGGSSGGKDEAEKAKRMKEWMKRITGGSSGGDEQEEMANAIITIL  
LQSWIFS (SEQ ID NO:327); или

20 GGSSGGLEDYAFNFELILEEIARLFESGGSSGGGGAEKAKRMKEWMKRIGGSSGGDEQEEMANAIITIL  
QSWIFS (SEQ ID NO:328).

Согласно примерным вариантам реализации полипептид содержит  
аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична  
первому или второму полипептидам, показанным в вариантах реализации (i)-(viii) выше  
(подчеркнутые остатки или остатки «X» являются необязательными, и каждый остаток  
25 необязательного домена, когда он присутствует, может содержать любую аминокислоту).

Согласно примерным вариантам реализации полипептид содержит  
аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична  
первому или второму полипептидам, показанным в вариантах реализации (i)-(viii) выше  
(подчеркнутые остатки или остатки «X» являются необязательными, и каждый остаток  
30 необязательного домена, когда он присутствует, может содержать любую аминокислоту).

Согласно примерным вариантам реализации полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 100% идентична первому или второму полипептидам, показанным в вариантах реализации (i)-(viii) выше (подчеркнутые остатки или остатки «X» являются необязательными, и каждый остаток 5 необязательного домена, когда он присутствует, может содержать любую аминокислоту).

Согласно другому варианту реализации X1, X2, X3 и X4, когда они присутствуют, содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична, соответственно, доменам X1, X2, X3 и X4 (определенным в Таблице 1), присутствующим в аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:11-94, 190-216, 247 и SEQ ID NO:275-300. Согласно конкретному варианту реализации X1, X2, X3 и X4, когда они присутствуют, содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична, соответственно, доменам X1, X2, X3 и X4 (определенным в Таблице 1 (при этом они перечислены как домены H1, H2, H3 и H4), присутствующим в аминокислотной последовательности вариантов 1 или 2 SEQ ID NO:90, которые имеют одинаковую первичную аминокислотную последовательность, но незначительно отличаются 15 необязательными/вариабельными линкерными остатками. Согласно различным вариантам реализации этот вариант реализации может включать варианты доменов X1, X2, X3 и/или X4, представленных в вариантах 1 или 2 SEQ ID NO:90, которые включают мутации относительно первичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:90, показанные в SEQ ID NO: 275-300.

Первые полипептиды, вторые полипептиды и полипептиды, описанные в настоящей заявке, могут быть синтезированы химическим путем или рекомбинантно экспрессированы (если полипептид является генетически кодируемым). Полипептиды могут быть связаны с другими соединениями, такими как стабилизирующие соединения, чтобы способствовать увеличению периода полужизни *in vivo*, включая, не ограничиваясь 30 перечисленным, альбумин, ПЭГилирование (присоединение одной или более цепей полиэтиленгликоля), HESилирование, PASилирование, гликозилирование, или могут продуцироваться в виде Fc-слияния или в деиммунизированных вариантах. Такая связь может быть ковалентной или нековалентной. Например, добавление фрагментов, содержащих полиэтиленгликоль («ПЭГ»), может включать присоединение группы ПЭГ, 35 связанной с малеимидной группой («ПЭГ-МАЛ»), к цистеиновому остатку полипептида.

Подходящими примерами ПЭГ-МАЛ являются метокси ПЭГ-МАЛ 5 кДа; метокси ПЭГ-МАЛ 20 кДа; метокси (ПЭГ)<sub>2</sub>-МАЛ 40 кДа; метокси ПЭГ(МАЛ)<sub>2</sub> 5 кДа; метокси ПЭГ(МАЛ)<sub>2</sub> 20 кДа; метокси ПЭГ(МАЛ)<sub>2</sub> 40 кДа; или любая их комбинация. См. также патент США № 8148109. Согласно другим вариантам реализации ПЭГ может содержать

5 ПЭГ с разветвленной цепью и/или несколько цепей ПЭГ.

В одном из вариантов реализации стабилизирующее соединение, включая, не ограничиваясь перечисленным, ПЭГ-содержащий фрагмент, связано с остатком цистеина в полипептиде. В еще одном варианте реализации остаток цистеина присутствует в домене Х2. В некоторых вариантах реализации остаток цистеина присутствует, например,

10 в любом из ряда положений в домене Х2. В некоторых таких вариантах реализации домен Х2 имеет длину по меньшей мере 19 аминокислот, а остаток цистеина находится в положениях 1, 2, 5, 9 или 16 относительно этих 19 аминокислот. Согласно дополнительному варианту реализации стабилизирующее соединение, включая, но не ограничиваясь этим, ПЭГ-содержащий фрагмент, связано с остатком цистеина за счет

15 малеимидной группы.

Согласно дополнительному варианту реализации первые полипептиды, вторые полипептиды и полипептиды могут дополнительно содержать нацеливающий домен. В этом варианте реализации условный агонист рецептора может быть направлен на мишень, представляющую интерес. Нацеливающий домен может быть ковалентно или

20 нековалентно связан с первым полипептидом, вторым полипептидом и/или полипептидом. В вариантах реализации, в которых нацеливающий домен связан нековалентно, для такого нековалентного связывания можно применять любые подходящие средства, включая, но не ограничиваясь перечисленными: линкеры стрептавидин-биотин.

В еще одном варианте реализации нацеливающий домен, когда он присутствует,

25 представляет собой трансляционное слияние с полипептидом. В этом варианте реализации полипептид и нацеливающий домен могут непосредственно примыкать друг к другу при трансляционном слиянии, или могут быть связаны полипептидным линкером, подходящим для предусмотренного назначения. Примеры таких линкеров включают, не ограничиваясь перечисленным, линкеры, раскрытые в WO2016178905, WO2018153865 (в частности, на с. 13) и WO 2018170179 (в частности, в абз. [0316]-[0317]). Согласно другим

30 вариантам реализации подходящие линкеры включают, не ограничиваясь перечисленным, пептидные линкеры, такие как GGGGG (SEQ ID NO:95), GSGGG (SEQ ID NO:96), GGGGGG (SEQ ID NO:97), GGSGGG (SEQ ID NO:98), GGSGGSGGSGGSGG (SEQ ID NO:99), GSGGSGGSGGSGGSGG (SEQ ID NO:100),

GGSGGGGGSGGGSGGGGGSGGGSGGGGGSGGGGG (SEQ ID NO:101) и [GGGGX]<sub>n</sub> (SEQ ID NO:102), где X представляет собой Q, E или S, и n равно 2-5.

Нацеливающие домены представляют собой полипептидные домены или малые молекулы, которые связываются с представляющей интерес мишенью. В одном неограничивающем варианте реализации нацеливающий домен связывается с белком клеточной поверхности; в этом варианте реализации клетка может относиться к любому представляющему интерес типу клеток, который включает поверхностный белок, который может быть связан подходящим нацеливающим доменом. В одном из вариантов реализации белки клеточной поверхности присутствуют на поверхности клеток, выбранных из группы, состоящей из опухолевых клеток, клеток сосудистого компонента опухоли, клеток микроокружения опухоли (например, фибробластов, инфильтрирующих иммунных клеток или стромальных элементов), других раковых клеток и иммунных клеток (включая, не ограничиваясь перечисленным, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки, НК-клетки или макрофаги). Когда белок клеточной поверхности находится на поверхности опухолевой клетки, клетки сосудистого компонента или клетки микроокружения опухоли (например, фибробластов, инфильтрирующих иммунных клеток или стромальных элементов), мишенью может быть любой подходящий поверхностный маркер опухолевой клетки, клетки сосудистого компонента или клетки микроокружения опухоли, включая, но не ограничиваясь перечисленными: EGFR, EGFRvIII, Her2, HER3, EpCAM, MSLN, MUC16, PSMA, TROP2, ROR1, RON, PD-L1, CD47, CTLA-4, CD5, CD19, CD20, CD25, CD37, CD30, CD33, CD40, CD45, CAMPATH-1, BCMA, CS-1, PD-L1, B7-H3, B7-DC, HLD-DR, карциноэмбриональный антиген (CEA), TAG-72, EpCAM, MUC1, связывающий фолат белок, A33, G250, простатоспецифический мембранный антиген (PSMA), ферритин, GD2, GD3, GM2, Le<sup>y</sup>, CA-125, CA19-9, эпидермальный фактор роста, p185HER2, рецептор IL-2, EGFRvIII (de2-7 EGFR), белок активации фибробластов, тенасцин, металлопротеиназу, эндосиалин, фактор роста эндотелия сосудов, avB3, WT1, LMP2, HPV E6, HPV E7, Her-2/neu, MAGE A3, немутированный p53, NY-ESO-1, MelanA/MART1, немутированный Ras, gp100, немутированный p53, PR1, bcr-abl, тирониназу, сурвивин, PSA, hTERT, саркомный белок точки разрыва при транслокации, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, ERG, NA17, PAX3, ALK, рецептор андрогенов, циклин B 1, полисиаловую кислоту, MYCN, RhoC, TRP-2, фукозил-GM1, мезотелин (MSLN), PSCA, MAGE A1, sLe (животных), CYP1B1, PLAV1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, карбоангидразу IX, PAX5, OY-TESL белок спермы 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, легумаин, Tie 3, VEGFR2, MAD-CT-1, PDGFR-B, MAD-CT-2, ROR2, TRAIL1, MUC16, MAGE A4,

MAGE C2, GAGE, EGFR, CMET, HER3, MUC15, CA6, NAPI2B, TROP2, CLDN6, CLDN16, CLDN18.2, CLorf186, RON, LY6E, FRA, DLL3, PTK7, STRA6, TMPRSS3, TMPRSS4, TMEM238, UPK1B, VTCN1, LIV1, ROR1, Fos-родственный антиген 1, BMPR1B (рецептор костного морфогенетического белка типа IB, номер доступа в Genbank NM. 001203); E16

5 (LAT1, SLC7A5, номер доступа в Genbank NM-003486); STEAP1 (шесть-трансмембранный эпителиальный антиген простаты, номер доступа в Genbank NM 012449); 0772P (CA125, MUC16, номер доступа в Genbank AF361486); MPF (MPF, MSLN, SMR, фактор потенцирования мегакариоцитов, мезотелин, номер доступа в Genbank NM 005823); Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, семейство носителей растворенных веществ

10 34 (фосфат натрия), член 2, натрийзависимый переносчик фосфата 3b типа II, номер доступа в Genbank NM 006424); Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm. 42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Hlog, сема-домен, семь тромбоспондиновых повторов (типа 1 и подобный типу 1), трансмембранный домен (TM) и короткий цитоплазматический домен (семафорин) 5B, номер доступа в Genbank AB040878); PSCA hlg (2700050C12Rik,

15 C530008O16Rik, кДНК RIKEN 2700050C12, кДНК гена RIKEN 2700050C12, номер доступа в Genbank AY358628); ETBR (рецептор эндотелина типа B, номер доступа в Genbank AY275463); MSG783 (RNF124, гипотетический белок FLJ20315, номер доступа в Genbank NM 017763); STEAP2 (HGNC.sub.--8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, ассоциированный с раком простаты ген 1, ассоциированный с раком простаты

20 белок 1, шесть-трансмембранный эпителиальный антиген простаты 2, шесть-трансмембранный белок простаты, номер доступа в Genbank AF455138); TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, катионный канал транзиторного рецепторного потенциала, подсемейство M, член 4, номер доступа в Genbank NM 017636); CRYPTO (CR, CR1, CRGF, CRYPTO, TDGF1, фактор роста, происходящий из тератокарциномы, номер доступа в

25 Genbank NP003203 или NM003212); CD21 (CR2 (рецептор компонента 2) или C3DR (рецептор вируса C3d/Эпштейна-Барр) или Hs. 73792, номер доступа в Genbank M26004); CD79b (IGb (иммуноглобулин-ассоциированный бета), B29, номер доступа в Genbank NM 000626); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (содержащий домен SH2 якорный белок фосфатазы 1a), SPAP1B, SPAP1C, номер доступа в Genbank NM030764); HER2 (номер

30 доступа в Genbank M11730); NCA (номер доступа в Genbank M18728); MDP (номер доступа в Genbank BC017023); IL20R.alpha. (номер доступа в Genbank AF184971); бревикан (номер доступа в Genbank AF229053); Ephb2R (номер доступа в Genbank NM004442); ASLG659 (номер доступа в Genbank AX092328); PSCA (номер доступа в Genbank AJ297436); GEDA (номер доступа в Genbank AY260763); BAFF-R (номер доступа

35 в Genbank NP443177.1); CD22 (номер доступа в Genbank NP-001762.1); CD79a (CD79A,

CD79.альфа, иммуноглобулин-ассоциированный альфа, специфичный для В-клеток белок, который ковалентно взаимодействует с Ig бета (CD79B) и образует комплекс на поверхности с молекулами Ig M, трансдуцирует сигнал, участвующий в дифференцировке В-клеток, номер доступа в Genbank NP001774.1); CXCR5 (рецептор 1 лимфомы Беркитта, рецептор, сопряженный с G-белком, который активируется хемокином CXCL13, участвует в миграции лимфоцитов и гуморальной защите, участвует в инфекции ВИЧ-2 и, возможно, в развитии СПИДа, лимфомы, миеломы и лейкоза, номер доступа в Genbank NP001707.1); HLA-DOB (бета-субъединица молекулы ГКГС класса II (антиген Ia), которая связывает пептиды и презентует их CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, номер доступа в Genbank NP002111.1); P2X5 (управляемый лигандом ионный канал 5 пуринергического рецептора P2X, ионный канал, управляемый внеклеточным АТФ, может участвовать в синаптической передаче и нейрогенезе, дефицит может вносить вклад в патофизиологию идиопатической нестабильности детрузора, номер доступа Genbank NP002552.2); CD72 (антиген дифференцировки В-клеток CD72, Lyb-2, номер доступа в Genbank NP001773.1); LY64 (антиген лимфоцитов 64 (RP105), мембранный белок типа I семейства богатых лейцином повторов (LRR), регулирует активацию В-клеток и апоптоз, потеря функции ассоциирована с повышенной активностью заболевания у пациентов с системной красной волчанкой, номер доступа в Genbank NP005573.1); FCRH1 (Fc-рецептор-подобный белок 1, предполагаемый рецептор для домена Fc иммуноглобулина, который содержит Ig-подобные домены типа C2 и домены ITAM, может участвовать в дифференцировке В-лимфоцитов, номер доступа в Genbank NP443170.1); или IRTA2 (ассоциированный с транслокацией рецептор суперсемейства иммуноглобулинов 2, предполагаемый иммунорецептор с возможными ролями в развитии В-клеток и лимфомагенезе; нарушение регуляции гена путем транслокации происходит при некоторых В-клеточных злокачественных опухолях, номер доступа в Genbank NP112571.1).

В еще одном варианте реализации нацеливающий домен связывается с поверхностными маркерами иммунных клеток. В этом варианте реализации мишенью могут быть белки клеточной поверхности на любой подходящей иммунной клетке, включая, не ограничиваясь перечисленным, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки, НК-клетки или макрофаги. Нацеливающий домен может быть нацелен на любой подходящий поверхностный маркер иммунной клетки (будь то эндогенная или генетически модифицированная иммунная клетка, включая, не ограничиваясь перечисленным, генетически модифицированные CAR-Т-клетки), включая, не ограничиваясь перечисленным, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD40, CD68, CD123, CD254, PD-1, B7-H3 и CTLA-4. В еще одном варианте

реализации нацеливающий домен связывается с PD-1, PDL-1, CTLA-4, TROP2, B7-H3, CD33, CD22, карбоангидразой IX, CD123, нектином-4, антигеном тканевого фактора, CD154, B7-H3, B7-H4, FAP (белком активации фибробластов) или MUC16, и/или где нацеливающий домен связывается с PD-1, PDL-1, CTLA-4, TROP2, B7-H3, CD33, CD22, карбоангидразой IX, CD123, нектином-4, антигеном тканевого фактора, CD154, B7-H3, B7-H4, FAP (белком активации фибробластов) или MUC16.

Во всех этих вариантах реализации нацеливающие домены могут представлять собой любые подходящие полипептиды, которые связываются с представляющими интерес мишенями и могут быть включены в полипептид согласно изобретению.

Согласно неограничивающим вариантам реализации нацеливающий домен может включать, но не ограничивается перечисленными: scFv, F(ab), F(ab')<sub>2</sub>, B-клеточный рецептор (BCR), DARPIn, аффитело, монотело, нанотело, диатело, антители (включая моноспецифичное или биспецифичное антители); олигопептид, нацеленный на клетку, включая, но не ограничиваясь перечисленными: пептиды, связывающие интегрин RGD, сконструированные de novo связывающие агенты, аптамеры, бициклический пептид, конотоксины, малые молекулы, такие как фолиевая кислота, и вирус, который связывается с поверхностью клетки.

Первые полипептиды, вторые полипептиды и полипептиды согласно настоящему раскрытию могут включать дополнительные остатки на N-конце, C-конце или на обоих, которые не присутствуют в первых полипептидах, вторых полипептидах и полипептидах согласно настоящему раскрытию; эти дополнительные остатки не включены в определение процента идентичности полипептидов или пептидных доменов согласно настоящему раскрытию относительно референсного полипептида. Такие остатки могут представлять собой любые остатки, подходящие для предполагаемого применения, включая, не ограничиваясь перечисленным, детектирующие метки (например, флуоресцентные белки, метки эпитопов антител и т. д.), адапторы, лиганды, подходящие для целей очистки (His-метки и т. д.), другие пептидные домены, придающие функциональность полипептидам и т. д. Остатки, подходящие для присоединения таких групп, могут включать остатки цистеина, лизина или п-ацетилфенилаланина, или могут представлять собой метки, такие как аминокислотные метки, подходящие для реакции с трансглутаминами, как раскрыто в патентах США № 9676871 и 9777070.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены нуклеиновые кислоты, включая выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие первые полипептиды, вторые полипептиды и полипептиды согласно настоящему раскрытию, которые могут кодироваться генетически. Выделенная последовательность нуклеиновой

кислоты может содержать РНК или ДНК. Такие выделенные последовательности нуклеиновых кислот могут содержать дополнительные последовательности, подходящие для содействия экспрессии и/или очистке кодируемого белка, включая, не ограничиваясь перечисленным, последовательности полиА, модифицированные последовательности Козак и последовательности, кодирующие эпитопные метки, сигналы экспорта и сигналы секретиции, сигналы ядерной локализации и сигналы локализации в плазматической мембране. Специалистам в данной области будет очевидно, на основании приведенного в настоящем документе руководства, какие последовательности нуклеиновых кислот будут кодировать полипептиды согласно изобретению.

10 Согласно другому аспекту настоящего раскрытия предложены векторы экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту согласно любому аспекту настоящего изобретения, функционально связанную с подходящей регуляторной последовательностью. «Вектор экспрессии» включает векторы, которые функционально связывают кодирующую область нуклеиновой кислоты или ген с любыми регуляторными последовательностями, способными осуществлять экспрессию продукта гена.

15 «Регуляторные последовательности», функционально связанные с последовательностями нуклеиновых кислот согласно изобретению, представляют собой последовательности нуклеиновых кислот, способные осуществлять экспрессию молекул нуклеиновых кислот. Регуляторные последовательности не обязательно должны быть смежными с

20 последовательностями нуклеиновых кислот при условии, что они выполняют функцию управления их экспрессией. Таким образом, например, между последовательностью промотора и последовательностями нуклеиновых кислот могут присутствовать промежуточные нетранслируемые, но транскрибируемые последовательности, и последовательность промотора по-прежнему может считаться «функционально связанной» с кодирующей последовательностью. Другие такие регуляторные последовательности включают, не ограничиваясь перечисленным, сигналы полиаденилирования, сигналы терминации и сайты связывания рибосом. Такие векторы экспрессии включают, не ограничиваясь перечисленным, векторы экспрессии на основе плазмид и вирусов. Регуляторная последовательность, используемая для управления

25 экспрессией раскрытых последовательностей нуклеиновых кислот в системе млекопитающих, может быть конститутивной (управляемой любым из множества промоторов, включая, не ограничиваясь перечисленным, CMV, SV40, RSV, актин, EF) или индуцибельной (управляемой любым из ряда индуцибельных промоторов, включая, не ограничиваясь перечисленным, тетрациклин, экдизон, стероид-зависимые). Вектор

30 экспрессии может иметь возможность реплицироваться в организмах-хозяевах либо в

35

виде эписомы, либо путем встраивания в хромосомную ДНК хозяина. Согласно различным вариантам реализации вектор экспрессии может включать плазмиду, вектор на вирусной основе (включая, не ограничиваясь перечисленным, ретровирусный вектор или онколитический вирус) или любой другой подходящий вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации вектор экспрессии может быть введен способами согласно изобретению для экспрессии полипептидов *in vivo* для достижения терапевтического эффекта. В неограничивающих вариантах реализации векторы экспрессии могут быть использованы для трансфекции или трансдукции клеточных терапевтических мишеней (включая, не ограничиваясь перечисленным, CAR-T-клетки или опухолевые клетки), для реализации раскрытых в настоящем документе методов терапии.

Согласно дополнительному аспекту настоящего раскрытия предложены клетки-хозяева, которые содержат векторы экспрессии и/или нуклеиновые кислоты, раскрытые в настоящей заявке, причем указанные клетки-хозяева могут быть как прокариотическими, так и эукариотическими. Клетки могут быть временно или стабильно генетически модифицированы для включения вектора экспрессии согласно изобретению с использованием методов, включающих, не ограничиваясь перечисленным, бактериальные трансформации, соосаждение с фосфатом кальция, электропорацию или опосредованную липосомами, опосредованную ДЭАЭ-декстраном, опосредованную поликатионами или опосредованную вирусом трансфекцию. (см., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2 изд.* (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY)). Способ получения полипептида согласно настоящему изобретению является дополнительной частью изобретения. Способ включает стадии (а) культивирования хозяина согласно данному аспекту настоящего изобретения в условиях, способствующих экспрессии полипептида, и (b) необязательно, выделения экспрессированного полипептида. Экспрессированный полипептид может быть выделен из бесклеточного экстракта, но предпочтительно их выделяют из культуральной среды.

Согласно другому аспекту настоящего раскрытия предложены фармацевтические композиции, содержащие один или более условно активных агонистов рецептора, полипептид, нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии и/или клетки-хозяева согласно любому аспекту или варианту реализации настоящего раскрытия и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции согласно изобретению могут применяться, например, в способах согласно изобретению, описанных ниже. Фармацевтическая композиция может содержать, помимо полипептида согласно изобретению, (а) лиопротектор; (b) поверхностно-активное вещество; (с)

объемообразующий агент; (d) агент, регулирующий тоничность; (e) стабилизатор; (f) консервант и/или (g) буфер.

В некоторых вариантах реализации буфер в составе фармацевтической композиции представляет собой Трис-буфер, гистидиновый буфер, фосфатный буфер, цитратный буфер или ацетатный буфер. Фармацевтическая композиция также может включать лиопротектор, например, сахарозу, сорбит или трегалозу. В отдельных вариантах реализации фармацевтическая композиция включает консервант, например, бензалкония хлорид, бензетоний, хлоргексидин, фенол, м-крезол, бензиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлорбутанол, о-крезол, п-крезол, хлоркрезол, нитрат фенолртути, тиомерсал, бензойную кислоту и различные их смеси. Согласно другим вариантам реализации фармацевтическая композиция включает объемообразующий агент, такой как глицин. Согласно другим вариантам реализации фармацевтическая композиция включает поверхностно-активное вещество, например, полисорбат-20, полисорбат-40, полисорбат-60, полисорбат-65, полисорбат-80, полисорбат-85, полоксамер-188, сорбитанмонолаурат, сорбитанмонопальмитат, сорбитанмоностеарат, сорбитанмоноолеат, сорбитантрилаурат, сорбитантристеарат, сорбитантриолеат или их комбинацию. Фармацевтическая композиция также может включать агент, регулирующий тоничность, например, соединение, делающее препарат по существу изотоничным или изоосмотичным крови человека. Примеры агентов, регулирующих тоничность, включают сахарозу, сорбит, глицин, метионин, маннит, декстрозу, инозит, хлорид натрия, аргинин и гидрохлорид аргинина. Согласно другим вариантам реализации фармацевтическая композиция дополнительно включает стабилизатор, например, молекулу, которая, будучи в комбинации с представляющим интерес белком, по существу предотвращает или уменьшает химическую и/или физическую нестабильность указанного представляющего интерес белка в лиофилизированной или жидкой форме. Примеры стабилизаторов включают сахарозу, сорбит, глицин, инозит, хлорид натрия, метионин, аргинин и гидрохлорид аргинина.

Условно активные агонисты рецептора, полипептиды, нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии и/или клетки-хозяева могут представлять собой единственный активный агент в фармацевтической композиции, или композиция может дополнительно содержать один или более других активных агентов, подходящих для предполагаемого применения.

Согласно дополнительному аспекту настоящего раскрытия предложены способы лечения рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества условно активного агониста рецептора, полипептида,

нуклеиновых кислот, векторов экспрессии и/или клеток-хозяев согласно любому варианту реализации или комбинации вариантов реализации, раскрытых в настоящей заявке, в условиях, в которых первый полипептидный компонент и второй полипептидный компонент взаимодействуют на клетках опухоли для лечения рака. В вариантах реализации введения условно активных агонистов рецептора первый и второй полипептиды могут быть введены вместе или могут быть введены в отдельных фармацевтических составах.

В контексте настоящего документа «лечить» или «лечение» означает достижение одного или более из следующего: (a) уменьшение размера или объема опухолей и/или метастазов у субъекта; (b) ограничение любого увеличения размера или объема опухолей и/или метастазов у субъекта; (c) увеличение выживаемости; (d) уменьшение выраженности симптомов, связанных с раком; (e) ограничение или предотвращение развития симптомов, связанных с раком; и (f) препятствование ухудшению симптомов, связанных с раком.

Способы можно применять для лечения любого подходящего рака, включая, но не ограничиваясь перечисленными: рак ободочной кишки, меланому, рак почек, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак желудка, уротелиальную карциному, лимфому Ходжкина, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, гепатоцеллюлярную карциному, рак поджелудочной железы, карциному из клеток Меркеля, колоректальный рак, острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, рак яичников, рак шейки матки и любые типы опухолей, выбранные с помощью диагностического теста, такого как микросателлитная нестабильность, мутационная нагрузка опухоли, уровень экспрессии PD-L1 или анализ Immunoscore<sup>®</sup> (разработанный Обществом иммунотерапии рака).

Субъект может представлять собой любого субъекта, который страдает раком. В одном из вариантов реализации субъект представляет собой млекопитающее, включая, не ограничиваясь перечисленным, человека, собак, кошек, лошадей, крупный рогатый скот и т. д.

Согласно одному варианту реализации первый нацеливающий домен связывается с клеточным маркером и второй нацеливающий домен связывается со вторым и отличающимся клеточным маркером, и при этом совместная экспрессия этих двух маркеров на одних и тех же или соседних клетках чаще происходит в опухоли, чем в других тканях, и при этом указанный первый полипептид и указанный второй полипептид взаимодействуют только после связывания первого нацеливающего домена с первым

клеточным маркером и связывания второго нацеливающего домена со вторым клеточным маркером. В этом варианте реализации, например, применяются два нацеливающих домена, которые связываются с отдельными маркерами, которые сами по себе не представлены на опухолевых клетках, но совместная экспрессия которых представлена в опухоли.

5  
10  
15  
20  
25  
30

Согласно другому варианту реализации первый полипептидный компонент содержит первый нацеливающий домен и второй полипептидный компонент содержит второй нацеливающий домен, причем указанный первый нацеливающий домен связывается с первым маркером опухолевой клетки, а второй нацеливающий домен связывается со вторым маркером опухолевой клетки, который может быть таким же или отличным от первого маркера опухолевой клетки, и при этом указанный первый полипептид и второй полипептид взаимодействуют только после связывания первого нацеливающего домена с первым маркером опухолевой клетки и связывания второго нацеливающего домена со вторым маркером опухолевой клетки.

15  
20  
25  
30

Согласно другому варианту реализации первый полипептидный компонент содержит первый нацеливающий домен и второй полипептидный компонент содержит второй нацеливающий домен, причем указанный первый нацеливающий домен связывается с маркером опухолевой клетки, а второй нацеливающий домен связывается с маркером иммунной клетки (включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки или макрофаги), и при этом указанный первый полипептид и второй полипептид взаимодействуют только после связывания первого нацеливающего домена с маркером опухолевой клетки и связывания второго нацеливающего домена с маркером иммунной клетки.

25  
30

Согласно одному варианту реализации первый нацеливающий домен связывается с клеточным маркером и второй нацеливающий домен связывается со вторым и отличающимся клеточным маркером, и при этом совместная экспрессия этих двух маркеров чаще встречается на опухолевых клетках, чем на некоторых других типах клеток, и при этом указанный первый полипептид и указанный второй полипептид взаимодействуют только после связывания первого нацеливающего домена с первым клеточным маркером и связывания второго нацеливающего домена со вторым клеточным маркером на той же клетке. В этом варианте реализации, например, применяются два нацеливающих домена, которые связываются с отдельными маркерами, которые сами по себе не представлены на опухолевых клетках, но для которых совместная экспрессия представлена в опухоли.

Согласно дополнительному варианту реализации первый полипептидный компонент содержит первый нацеливающий домен и второй полипептидный компонент содержит второй нацеливающий домен, причем указанный первый нацеливающий домен связывается с первым маркером иммунной клетки (включая, но не ограничиваясь 5 перечисленными: CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки или макрофаги), а второй нацеливающий домен связывается со вторым маркером иммунной клетки (включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки или макрофаги), который может быть аналогичным или отличаться от первого маркера иммунной клетки, и при этом указанный первый 10 полипептид и второй полипептид взаимодействуют только после связывания первого нацеливающего домена с первым маркером иммунной клетки и связывания второго нацеливающего домена со вторым маркером иммунной клетки.

Согласно дополнительному аспекту настоящего раскрытия предложены способы модуляции иммунного ответа у субъекта путем введения субъекту условно активного 15 агониста рецептора, полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора экспрессии, клетки-хозяина или фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию. Согласно одному варианту реализации способ включает введение субъекту условно активного агониста рецептора в условиях, в которых первый полипептидный компонент и второй полипептидный компонент взаимодействуют на иммунных клетках с модуляцией 20 иммунного ответа.

В контексте настоящего документа модулируемый «иммунный ответ» относится к ответу клетки иммунной системы, такой как В-клетка, Т-клетка (CD4 или CD8), регуляторная Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, дендритная клетка, моноцит, макрофаг, НКТ-клетка, НК-клетка, базофил, эозинофил или нейтрофил, на стимул. В 25 некоторых вариантах реализации ответ является специфичным для конкретного антигена («антигенспецифический ответ») и относится к ответу CD4 Т-клетки, CD8 Т-клетки или В-клетки через их антигенспецифический рецептор. В некоторых вариантах реализации иммунный ответ представляет собой Т-клеточный ответ, такой как ответ CD4<sup>+</sup> или ответ CD8<sup>+</sup>. Такие ответы этих клеток могут включать, например, цитотоксичность, 30 пролиферацию, продукцию цитокинов или хемокинов, направленную миграцию или фагоцитоз, и могут зависеть от природы иммунной клетки, подвергающейся ответу. В некоторых вариантах реализации композиций и способов, описанных в настоящем документе, модулируемый иммунный ответ опосредован Т-клетками.

Согласно некоторым аспектам иммунный ответ представляет собой 35 противораковый иммунный ответ. В некоторых таких аспектах условно активный

миметик IL-2, описанный в настоящей заявке, вводят субъекту, страдающему раком, для модуляции противоракового иммунного ответа у субъекта.

Согласно некоторым аспектам иммунный ответ представляет собой тканерегенеративный иммунный ответ. В некоторых таких аспектах условно активный миметик IL-4, описанный в настоящей заявке, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, для модуляции тканерегенеративного иммунного ответа у субъекта.

Согласно некоторым аспектам иммунный ответ представляет собой ранозаживляющий иммунный ответ. В некоторых таких аспектах условно активный миметик IL-4, описанный в настоящей заявке, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, для модуляции ранозаживляющего иммунного ответа у субъекта.

Согласно некоторым аспектам предложены способы модуляции иммунного ответа на второй терапевтический агент у субъекта. В некоторых таких аспектах способ включает введение субъекту полипептида согласно настоящему изобретению в сочетании с эффективным количеством второго терапевтического агента. Вторым терапевтическим агентом может представлять собой, например, химиотерапевтический агент или антигенспецифический иммунотерапевтический агент. Согласно некоторым аспектам антигенспецифический иммунотерапевтический агент включает Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-T-клетки). Согласно некоторым аспектам полипептид согласно настоящему изобретению усиливает иммунный ответ субъекта на терапевтический агент. Иммунный ответ может быть усилен, например, путем улучшения Т-клеточного ответа (включая ответ CAR-T-клеток), усиления врожденного иммунного Т-клеточного ответа, снижения воспаления, ингибирования активности регуляторных Т-клеток или их комбинаций.

Согласно некоторым аспектам условно активный миметик цитокина согласно настоящему изобретению, например, условно активный миметик IL-4, описанный в настоящей заявке, будет импрегнирован или иным образом ассоциирован с биоматериалом, и биоматериал будет введен субъекту. Согласно некоторым аспектам указанный биоматериал будет представлять собой компонент имплантируемого медицинского устройства, и устройство будет, например, покрыто указанным биоматериалом. Такие медицинские устройства включают, например, сосудистые и артериальные трансплантаты. Биоматериалы, ассоциированные с условно активным IL-4 и/или IL-4, можно применять, например, для стимуляции заживления ран и/или восстановления и регенерации ткани.

Согласно другому аспекту настоящего раскрытия предложены способы агонистического действия на рецептор IL-2 или рецептор IL-4, включающие введение

субъекту условно активного агониста рецептора согласно любому варианту реализации или комбинации вариантов реализации, раскрытых в настоящей заявке, в условиях, в которых первый полипептидный компонент и второй полипептидный компонент взаимодействуют на рецепторе.

- 5 В настоящей заявке термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству условно активного агониста рецептора, полипептида, нуклеиновых кислот, векторов экспрессии и/или клеток-хозяев которое эффективно для лечения и/или
- ограничения заболевания, подлежащего лечению (например, рака). Условно активный агонист рецептора, полипептиды, нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии и/или
- 10 клетки-хозяева, как правило, изготавливают в виде фармацевтической композиции, такой как те, которые раскрыты выше, и могут быть введены любым подходящим путем, включая, но не ограничиваясь перечисленными: перорально, с помощью ингаляционного спрея, окулярно, внутривенно, подкожно, внутривентриально и интравезикулярно в
- стандартных лекарственных формах, содержащих обычные фармацевтически приемлемые
- 15 носители, адъюванты и среды. В одном частном варианте реализации полипептиды, нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии и/или клетки-хозяева вводят через слизистую оболочку, включая, не ограничиваясь перечисленным, внутриглазное, ингаляционное или интраназальное введение. В еще одном частном варианте реализации полипептиды, нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии и/или клетки-хозяева вводят перорально.
- 20 Такие частные варианты реализации могут быть введены в виде капель, распылителей, спреев или других подходящих препаратов.

- Может быть использован любой подходящий диапазон доз, определенный лечащим медицинским персоналом. Режимы дозирования также можно регулировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или
- 25 профилактического ответа). Подходящий диапазон дозировки для условно активных агонистов рецептора или полипептидов может составлять, например, от 0,1 мкг/кг до 100 мг/кг массы тела; альтернативно, он может составлять от 0,5 мкг/кг до 50 мг/кг; от 1 мкг/кг до 25 мг/кг или от 5 мкг/кг до 10 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах реализации рекомендуемая доза может быть ниже 0,1 мкг/кг, особенно при локальном
- 30 введении. Согласно другим вариантам реализации рекомендуемая доза может быть основана на массе тела/ $m^2$  (т. е. площади поверхности тела), и/или она может быть введена в виде фиксированной дозы (например, 0,05-100 мг). Условно активные агонисты рецептора, полипептиды, нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии и/или клетки-хозяева могут быть доставлены в одном болюсе или могут быть введены более одного раза
- 35 (например, 2, 3, 4, 5 или более раз), как определено лечащим врачом.

Условно активные агонисты рецептора, полипептиды, нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии и/или клетки-хозяева могут быть введены в качестве единственного профилактического или терапевтического агента или могут быть введены вместе (то есть: комбинировано или по отдельности) с одним или более другими профилактическими или терапевтическими агентами, включая, но не ограничиваясь перечисленными: резекцию опухоли, химиотерапию, лучевую терапию, иммунотерапию и т. д.

В свете вышеизложенного возможно множество модификаций и вариаций настоящего изобретения.

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1.

Описана вычислительная методика моделирования *de novo* миметиков цитокинов, которые воспроизводят функциональные сайты природных цитокинов, но в остальном не родственны по топологии или аминокислотной последовательности. Эту стратегию использовали для моделирования *de novo* нерасщепленных миметиков IL-2 и интерлейкина-15 (IL-15), которые связываются с гетеродимером  $\beta_c$  рецептора IL-2 (IL-2R $\beta_c$ ), но не содержат сайт связывания для IL-2R $\alpha$  или IL-15R $\alpha$ . Модели сверхстабильны, связываются с человеческим и мышинным IL-2R $\beta_c$  с более высокой аффинностью, чем природные цитокины, и вызывают нисходящую клеточную передачу сигналов независимо от IL-2R $\alpha$  и IL-15R $\alpha$ . Кристаллические структуры экспериментально оптимизированного миметика, неoleyкина-2/15, очень близки к расчетной модели и дают первую структурную информацию о мышинном комплексе IL-2R $\beta_c$ . Неoleyкин-2/15 обладает высокоэффективной терапевтической активностью по сравнению с IL-2 в моделях меланомы и рака ободочной кишки на мышах, с пониженной токсичностью и без признаков иммуногенности.

Многие цитокины взаимодействуют с множеством различных рецепторных субъединиц и, как большинство природных белков, содержат неидеальные структурные признаки, которые отрицательно влияют на стабильность, но важны для функции. Был разработан вычислительный протокол, в котором структурные элементы, взаимодействующие с желаемой субъединицей(ами) рецептора, фиксируются в пространстве, и для поддержки этих элементов выстраивается идеализированная глобулярная структура белка. Комбинаторную сборку фрагментов использовали для

поддержки коротких линейных эпитопов с параметрической конструкцией рассматриваемых по отдельности спиралей, в сочетании с закрытием петли на основе имеющихся знаний (Фигура 1a-b). Этот подход был протестирован путем попытки моделирования *de novo* стабильных идеализированных белков с поверхностями взаимодействия, имитирующими поверхности взаимодействия человеческого IL-2 (hIL-2) и человеческого IL-15 (hIL-15) с человеческим IL-2R $\beta_c$  (hIL-2R $\beta_c$ ), но полностью лишенных поверхности взаимодействия с рецептором IL-2 альфа (IL-2R $\alpha$ ).

**Вычислительное моделирование нерасщепленных миметиков IL-2/IL-15, которые связывают и активируют IL-2R $\beta_c$ :** нативный hIL-2 содержит четыре спирали, соединенные длинными нерегулярными петлями. N-концевая спираль (H1) взаимодействует как с бета-, так и с гамма-субъединицами рецептора IL-2, третья спираль (H3) взаимодействует с бета-субъединицей, а C-концевая спираль (H4) - с гамма-субъединицей; поверхность взаимодействия альфа-субъединицы образована нерегулярной второй спиралью (H2) и двумя длинными петлями, одна из которых соединяет H1 и H2, а другая - H3 и H4. Был смоделирован идеализированный белок, воспроизводящий поверхность связывания, образованную H1, H3 и H4 с бета- и гамма-, где H2 заменен на регулярную спираль, которая обеспечивает лучшую упаковку. Спирали H1, H3 и H4 (см. ФИГ. 1a) использовали в качестве шаблона для сайта связывания, а спираль H2 была воссоздана (H2') с использованием базы данных широко представленных кластеризованных фрагментов (см. Методы). Пары спиралей соединяли с петлями, извлеченными из той же базы данных (см. Фигуру 1b), полученные спиральные шпильки объединяли в полностью соединенные остовы (см. Фигуру 1c), и расчеты модели комбинаторной последовательности гибкого остова с помощью Rosetta™ осуществляли в присутствии hIL-2R $\beta_c$  (см. Методы). Для экспериментального определения характеристик с помощью дрожжевого дисплея выбрали четыре лучшие вычислительные модели и восемь вариантов, скрепленных одним дисульфидом (см. Таблицу 2) (см. Методы). Было обнаружено, что восемь моделей связывают флуоресцентно меченый химерный рецептор IL-2 бета-гамма при низких наномолярных концентрациях. Самую лучшую недисульфидную модель (G1\_neo2\_40) подвергали мутагенезу с насыщением сайтов с последующим отбором и комбинацией замен, повышающих аффинность в отношении мышинового IL-2R $\beta_c$  (mIL-2R $\beta_c$ , см. Фигуру 5). Оптимизированные модели были рекомбинантно экспрессированы в *E. coli*, и было обнаружено, что они вызывают передачу сигналов pSTAT5 *in vitro* на IL-2-чувствительных мышинных клетках в низких наномолярных или даже пикомолярных концентрациях (Таблица 3, см. Silva et al., Nature 35 565, pg. 186, January 10, 2019), но имели относительно низкую термическую стабильность

( $T_m \sim <45^\circ\text{C}$ , см. Фигуры 9 и 10). Для повышения стабильности протокол вычислительного моделирования повторяли, начиная с остова модели первого этапа моделирования с самой высокой аффинностью (G1\_neo2\_40\_1F, топология:  $\text{H1} \rightarrow \text{H4} \rightarrow \text{H2}' \rightarrow \text{H3}$ ), связывая процесс построения петли с изменением параметра длины спирали ( $\pm 8$  аминокислот, см. нижнюю панель на ФИГ. 1а). Этот второй подход улучшил качество моделей, позволив исследовать значительно больше комбинаций петель, соединяющих каждую пару спиралей. Четырнадцать лучших моделей второго поколения, наряду с двадцатью семью повторными моделями последовательности G1\_neo2\_40\_1F с помощью Rosetta<sup>TM</sup> (см. Таблицу 4), были охарактеризованы экспериментально, и было обнаружено, что все, кроме одной, связывают рецептор IL-2 в низких наномолярных концентрациях. Три модели с наибольшей аффинностью и стабильностью (одна повторная модель последовательности и два новых миметика) подвергали мутагенезу с насыщением сайтов для связывания mIL-2R $\beta_c$  (Фигуры 6-8) с последующим отбором и комбинацией замен, повышающих аффинность в отношении человеческого и мышинового IL-2R $\beta_c$ . Зрелые модели (см. Таблицу 5) показали улучшенное связывание при сохранении сверхстабильности (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019). Самая лучшая модель, неoleyкин-2/15 (также называемый в настоящей заявке Neo-2/15), представляет собой белок из 100 остатков с новой топологией и последовательностью, отличающейся в некоторой степени от человеческого или мышинового IL-2 (29% идентичности последовательности с hIL-2 более чем в 89 остатках и 16% идентичности последовательности с mIL-2 более чем в 76 выравненных остатках при выравнивании, не зависящем от структурной топологии).

**Функциональная характеристика неoleyкина-2/15:** неoleyкин-2/15 связывается с высокой аффинностью с человеческим и мышинным IL-2R $\beta_c$ , но не взаимодействует с IL-2R $\alpha$  (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019). Аффинности неoleyкина-2/15 к человеческому и мышинному рецепторам IL-2 (IL-2R $\beta$  и IL-2R $\beta_c$ ) значительно выше, чем у соответствующих нативных цитокинов IL-2. В отличие от нативного IL-2, неoleyкин-2/15 вызывает независимую от IL-2R $\alpha$  передачу сигналов как в клетках, чувствительных к человеческому IL-2, так и в клетках чувствительных к мышинному IL-2, а также в мышинных первичных Т-клетках (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019). Неoleyкин-2/15 активирует IL-2R $\alpha$ -клетки более эффективно, чем нативный человеческий или мышинный IL-2, что согласуется с его более высокой аффинностью связывания. В первичных клетках неoleyкин-2/15 более активен в отношении IL-2R $\alpha$ -клеток и менее активен в отношении IL-2R $\alpha^+$  по сравнению с Super-2, предположительно из-за полного отсутствия у него связывания с IL-2R $\alpha$ . Неoleyкин-2/15 является

сверхстабильным (см. Фигуру 12) и не теряет аффинность связывания в отношении hIL-2R $\beta$ c после инкубации при 80°C в течение 2 часов, в то время как hIL-2 и Super-2 полностью инактивируются через 10 минут (половинное время инактивации = ~4,2 мин и ~2,6 мин, соответственно, Фигура 2). Аналогичным образом, в первичных культурах клеток *ex vivo* неолейкин-2/15 эффективно запускал выживание Т-клеток после кипячения в течение 60 минут при 95°C, в то время как эти условия инактивировали как IL-2, так и Super-2 (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019). Исследования термической денатурации осуществляли на многих других сконструированных миметиках, что также продемонстрировало их термическую стабильность (см. Фигуру 11). Данная беспрецедентная стабильность цитокиноподобной молекулы, помимо устранения потребности в хранении в холодной цепи, предполагает устойчивость к мутациям (см. Фигуру 8 и 13), генетическим слияниям и химической модификации, которые значительно превышают эти показатели для нативного IL-2 (см. Фигуру 3).

**Терапевтические приложения неолейкина-2/15:** клиническое применение IL-2 в основном ограничено токсичностью. Хотя взаимодействия, ответственные за токсичность IL-2 у людей, изучены не полностью, в моделях на мышах токсичность не зависит от Т-клеток и снижается у животных, лишенных  $\alpha$ -цепи IL-2R (CD25+). Таким образом, многие усилия были направлены на перестройку IL-2 для ослабления взаимодействий с IL-2R $\alpha$ , но мутации в сайте связывания CD25 могут быть очень дестабилизирующими. Присущая IL-2 низкая стабильность и его сильная выраженная зависимость от CD25 были препятствиями на пути трансляции перестроенных соединений IL-2. Другие усилия были сосредоточены на IL-15, поскольку он вызывает передачу сигналов, сходную с таковой IL-2, путем димеризации IL-2R $\beta$ c, но не обладает аффинностью в отношении CD25. Однако IL-15 зависит от транс-презентации рецептором IL-15 $\alpha$  (CD215), который главным образом экспонируется на антигенпрезентирующих клетках и естественных киллерах. Низкая стабильность нативного IL-15 и его зависимость от транс-презентации также были существенными препятствиями при попытках перестройки.

Исследования с увеличением дозы на наивных мышах показывают, что mIL-2 вызывает размножение преимущественно регуляторных Т-клеток, что согласуется с преимущественным связыванием с CD25<sup>+</sup> клетками, в то время как неолейкин-2/15 в первую очередь запускает размножение CD8<sup>+</sup> Т-клеток и не индуцирует или минимально индуцирует размножение регуляторных Т-клеток только при самой высокой испытанной дозе. Аналогичным образом, в мышинной модели воспаления дыхательных путей, которое обычно индуцирует небольшой процент тканевых резидентных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, неолейкин-2/15 вызывает увеличение количества Thy1.2<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток без

увеличения количества  $CD4^+ Foxp3^+$  антигенспецифичных Treg в лимфоидных органах (данные не показаны; см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019).

Терапевтическая эффективность неoleyкина-2/15 была протестирована на моделях низкоиммуногенной меланомы B16F10 и более иммуногенного рака ободочной кишки CT26 на мышах. Монотерапия неoleyкином-2/15 привела к дозозависимым задержкам роста опухолей в обеих моделях рака. При раке ободочной кишки CT26 лечение одним агентом показало улучшенную эффективность по сравнению с наблюдаемой для рекомбинантного mIL-2 (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019). При меланоме B16F10 совместное лечение антителом против меланомы TA99 (анти-TRP1) приводило к значительной задержке роста опухоли, в то время как лечение только TA99 имело небольшой эффект (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019). В экспериментах по долгосрочной выживаемости (8 недель) неoleyкин-2/15 в комбинации с TA99 показал существенно сниженную токсичность и лучший общий терапевтический эффект по сравнению с mIL-2 (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019). Мыши, получавшие комбинацию mIL-2 и TA99, стабильно теряли массу, и их общее состояние здоровья ухудшалось до точки, требующей эвтаназии, в то время как при использовании комбинации неoleyкина-2/15 и TA99 наблюдалось небольшое снижение (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019). В соответствии с терапевтической пользой лечение неoleyкином-2/15 привело к значительному увеличению внутриопухолевых соотношений  $CD8:T_{reg}$  (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019), что ранее коррелировало с эффективными противоопухолевыми иммунными ответами<sup>58</sup>. Увеличение соотношений  $CD8:T_{reg}$  под действием неoleyкина-2/15 зависит от дозы и антигена (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019); оптимальные терапевтические эффекты были получены при более высоких дозах и в комбинации с другими видами иммунотерапии (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019). В совокупности эти данные показывают, что неoleyкин-2/15 проявляет спрогнозированный эффект гомеостатической пролиферации, обусловленный его IL-2-подобной иммуностимулирующей активностью, но без побочных действий, связанных с избирательным связыванием  $CD25^+$ . Терапевтическую эффективность неoleyкина-2/15 тестировали в модели CAR-T. Мыши NSG, инокулированные  $0,5 \times 10^6$  опухолевых клеток RAJI, не получали никакого лечения, получали лечение  $0,8 \times 10^6$  анти-CD19 CAR-T-клеток (вводимых путем инфузии через 7 дней после инокуляции опухолевых клеток) или аналогичным образом получали лечение анти-CD19 CAR-T-клетками вместе с 20 мкг/сут человеческого IL-2 или неoleyкина-2/15 на 8-14 дни после инокуляции опухоли. Как и ожидалось, было показано, что неoleyкин-2/15 значительно усиливает противоопухолевый эффект терапии CAR-T-клетками,

замедляя рост опухоли и продлевая выживаемость мышей (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019).

5 Моделирование *de novo* белковых миметиков может трансформировать область терапевтических средств на основе белков, позволяя разрабатывать биологически более совершенные молекулы с улучшенными терапевтическими свойствами и уменьшенными побочными эффектами. В отличие от рекомбинантного IL-2 и перестроенных вариантов hIL-2 неолейкин-2/15 может быть экспрессирован в растворимом виде в *E. coli* (см. Фигуру 17), сохраняет активность при высокой температуре, не взаимодействует с IL-2R $\alpha$  и устойчив к существенным изменениям последовательности, которые позволяют  
10 сконструировать новые функции (Фигура 7).

**Надежная модульность неолейкина-2/15. Скрепление дисульфидными скобками и перестройка в миметик IL-4:** неолейкин-2/15 имеет высокую модульность, что позволяет легко настраивать его свойства, например, повышать его стабильность или изменять избирательность его связывания. Данную модульность и надежность  
15 использовали в своих интересах за счет введения, с помощью вычислительного моделирования, повышающих стабильность скрепок одним дисульфидом, которые сохраняют функцию неолейкина-2/15. В одном примере дисульфидный мостик вводили путем поиска пар положений с благоприятными геометрическими группировками с последующей минимизацией гибкого остова. В окончательную модель была введена  
20 единственная дисульфидная связь между остатками 38 и 75, которая стабилизирует спирали H3 и H2. Эта стратегия увеличивала стабильность неолейкина-2/15 ( $T_m > 95^\circ\text{C}$ ), сохраняя при этом его последовательность и функцию в основном неизменными (см. Silva et al., Nature 565, pg. 186, January 10, 2019). Свойства модульности неолейкина-2/15 использовали для изменения избирательности его связывания. Все цитокины семейства  
25 интерлейкинов-2 взаимодействуют с  $\gamma_c$  и имеют общую структуру. Таким образом, была выдвинута гипотеза, что неолейкин-2/15 может быть преобразован в другой цитокиновый цитокина миметик семейства IL-2 путем изменения только аминокислот в половине сайта связывания, которая взаимодействует с IL-2R $\beta$  (спирали H1 и H3). В качестве доказательства концепции в качестве мишени был выбран человеческий интерлейкин-4  
30 (hIL-4), поскольку он имеет обширную структурную гомологию с IL-2 и имеет потенциальные приложения в регенеративной медицине. Neo-2/15 модифицировали для связывания с человеческим рецептором IL-4 (содержащим IL-4R $\alpha$  и  $\gamma_c$ ), но не с человеческим рецептором IL-2 (содержащим IL-2R $\beta$  и  $\gamma_c$ ) путем выравнивания модели Neo-2/15 со структурой человеческого IL-4, связанного с его рецептором IL-4, и мутируя 14  
35 остатков в Neo-2/15, чтобы соответствовать аминокислотам IL-4 в тех структурных

положениях, которые опосредуют взаимодействия между IL-4 и IL4r (Фигура 3).

Связывание было дополнительно оптимизировано путем направленной эволюции с использованием случайного мутагенеза и скрининга вариантов с высокой аффинностью связывания, в результате чего было введено две дополнительные аминокислотные замены и был модифицирован один из четырнадцати исходных остатков, привитых из белка IL-4, с получением тем самым нового белка неoleyкина-4, содержащего в общей сложности шестнадцать мутаций относительно неoleyкина-2/15. Полученную в результате оптимизированную модель, неoleyкин-4 (см. Таблицу 6), рекомбинантно экспрессировали и очищали из *E. coli* и тестировали в отношении связывания. Неoleyкин-4 связывается с высокой аффинностью с рецептором IL-4R $\alpha$ , кооперативно связывается с IL-4R $\alpha$  $\beta$  (см. Фигуру 3), и не связывается с какой-либо аффинностью с рецептором IL-2 (данные не показаны). Неoleyкин-4 сохраняет превосходные термостабильные свойства неoleyкина-2/15 (см. Фигуру 14b, c) и связывается с рецептором IL-13, как и ожидалось с учетом природной перекрестной реактивности IL-4 с рецептором IL-13 (данные не показаны).

15

## Методы

### Вычислительное моделирование миметиков цитокинов *de novo*:

моделирование миметиков цитокинов *de novo* начали с определения структуры hIL-2 в четырехкомпонентном комплексе с рецептором IL-2R $\beta$  $\gamma$  качестве шаблона для моделирования. После проверки остатки, составляющие сайт связывания, были определены как горячие точки с использованием метаданных Rosetta<sup>TM</sup> (PDBInfoLabels). Структуру вводили в протокол моделирования нового миметика, который запрограммирован в PyRosetta<sup>TM</sup>, и который может автоматически обнаруживать элементы ядро-вторичная структура, которые составляют целевой шаблон, и создавать в результате остовы миметиков *de novo* с полной информацией для моделирования, совместимой с RosettaScripts<sup>TM</sup>. Вкратце, алгоритм построения миметика работает следующим образом. Для первого поколения моделей каждый из элементов ядра был идеализирован путем воссоздания с использованием петель из кластеризованной базы данных высокоидеальных фрагментов (размер фрагмента - 4 аминокислоты). После идеализации протокол построения миметика направлен на повторное связывание идеализированных элементов попарно во всех возможных комбинациях. Для этого в нем используется комбинаторная сборка фрагментов, не зависящих от последовательности, из базы данных, за которой следует минимизация остова с ограничением декартовых координат для поиска потенциальных решений (то есть, когда N- и C-концы построенного

фрагмента достаточно близки, чтобы связать две вторичные структуры). После минимизации решения проверяются на предмет наличия высокоидеальных фрагментов (т. е. что каждый перекрывающийся фрагмент, содержащий два связанных элемента, также содержится в базе данных) и отсутствия конфликтов остова с рецептором-мишенью (контекстным). Затем был составлен профиль подходящих решений остовов с использованием той же базы данных фрагментов, чтобы определить наиболее вероятные аминокислоты в каждом положении (эта информация была закодирована в метаданных по модели). Затем решения для пар связанных вторичных структур были комбинаторно рекомбинированы для создания полностью связанных остовов с использованием связанных компонентов согласно теории графов. Поскольку количество решений растет экспоненциально с каждой парой элементов, на каждом этапе комбинирования фрагментов авторы ранжировали модели, отдавая предпочтение моделям с более короткими связями между парами элементов ядра, и оставляли только лучшие решения, переходя к следующему этапу. Затем был составлен профиль полностью связанных решений по слоям (поверхность связывания, ядро, неядерная поверхность, поверхность), чтобы ограничить принадлежность возможных аминокислот, чтобы они были совместимы со слоями. Наконец, была объединена вся информация о горячих точках, совместимых построенных фрагментах аминокислот и слоях (горячая точка имеет приоритет над вероятностью аминокислоты, а вероятность аминокислоты имеет приоритет над слоем). Затем эти полностью профилированные остовы передавали в RosettaScripts™ для моделирования гибкого остова и фильтрации. Для второго поколения моделей использовали два подхода. При первом подходе выполняли повторные моделирования последовательности лучших оптимизированных моделей первого поколения (G1\_neo2\_40\_1F). Во втором подходе новые миметики были перестроены с использованием G1\_neo2\_40\_1F в качестве целевого шаблона. Протокол моделирования миметиков в этом втором поколении был аналогичен протоколу, описанному для первого поколения, но с двумя ключевыми отличиями. Во-первых, фрагменты ядра больше не строились из фрагментов, а вместо этого были получены из решения параметрических уравнений повторяющихся углов  $\phi$  и  $\psi$  (омега фиксирована при  $180^\circ$ ), приводящим к повторяющимся вторичным структурам, которые воспроизводят каждую из целевых спиралей как можно ближе, «шаг» углов  $\phi$  и  $\psi$  допускался для каждой X-аминокислоты, чтобы позволить спиральям иметь возможность иметь искривление (конечные параметры: N1, N2, N3, N4), решение этих параметрических уравнений позволило изменять размер каждого из элементов ядра в целевой структуре по желанию (увеличивать или уменьшать размер), что было связано (макс/мин 8 АК) с процессом построения петли, и не были

разрешены уменьшения размера элементов ядра, удаляющие горячие точки из сайта связывания. Второе отличие моделей второго поколения состоит в том, что вместо повторного связывания элементов ядра вторичной структуры авторы использовали фрагмент размером 7 аминокислот, и комбинаторная сборка более чем одного фрагмента не была разрешена (т. е. один фрагмент должен иметь возможность замкнуть пару вторичных структур). Остальная часть алгоритма моделирования была по существу аналогична алгоритму, использованному в первом поколении. Используемые энергетические функции Rosetta<sup>TM</sup> представляли собой «talaris2013» и «talaris2014» для первого и второго поколения моделей, соответственно.

10 Базы данных высокоидеальных фрагментов, используемых для моделирования остовов для *de novo* миметиков, конструировали с помощью нового приложения Rosetta<sup>TM</sup> «kcenters\_clustering\_of\_fragments», использующего обширную базу данных неизбыточных общедоступных белковых структур из банка данных белков RCSB, которая состояла из 16767 PDB для 4-членной базы данных, используемой для моделей первого поколения, и 15 7062 PDB для 7-членной базы данных, используемой для моделей второго поколения.

**Дрожжевой дисплей:** дрожжи трансформировали генами, кодирующими белки, которые должны экспонироваться вместе с линейаризованным вектором pETcon3. Вектор линейаризовали путем 100-кратно превышенного расщепления с помощью NdeI и XhoI (New England Biolabs), а затем очищали гель-экстракцией (Qiagen). Гены включали 50 оснований перекрытия с вектором как на 5'-, так и на 3'-концах, так, чтобы гомологичная рекомбинация поместила гены в рамку считывания между геном AGA2 и мус-меткой в векторе. Дрожжи выращивали в среде C-Trp-Ura перед индукцией в среде SGCAA, как описано ранее. Через 12-18 часов после индукции клетки промывали охлажденным буфером для экспонирования (50 mM NaPO<sub>4</sub> при pH 8, 20 mM NaCl, 0,5% BSA) и 25 инкубировали с различными концентрациями биотинилированного рецептора (человеческого или мышинового IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , IL-2R $\gamma$  или человеческого IL-4R $\alpha$ ) при перемешивании при 4 °C. Примерно через 30 минут клетки снова промывали охлажденным буфером, а затем инкубировали на льду в течение 5 минут с FITC-конъюгированным антителом к с-Мус (1 мкл на 3x10<sup>6</sup> клеток) и стрептавидин-30 фикоэритрином (1 мкл на 100 мкл объема дрожжей). Затем дрожжи промывали и подсчитывали с помощью проточной цитометрии (Accuri C6) или сортировали с помощью FACS (Sony SH800). Для экспериментов, в которых начальная инкубация рецептора проводилась с комбинацией биотинилированного IL-2R $\gamma$  и небитинилированного IL-4R $\alpha$ , небитинилированный рецептор был обеспечен в молярном избытке.

**Мутагенез и созревание аффинности:** для мутагенеза на основе подверженной ошибкам ПЦР модель, подлежащую мутации, клонировали в вектор pETcon3 и амплифицировали с использованием набора для мутагенеза MutaGene™ II (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя, чтобы получить частоту мутаций примерно 1% на нуклеотид. 1 мкг этого мутированного гена электропорировали в дрожжи EBY100 вместе с 1 мкг линейаризованного вектора pETcon3 с эффективностью трансформации порядка  $10^8$ . Дрожжи индуцировали и сортировали несколько раз подряд с постепенно уменьшающимися концентрациями рецептора до конвергенции популяции. Дрожжи наращивали в среде C-Trp-Ura между каждой сортировкой.

Библиотеки сайт-насыщающего мутагенеза (SSM) конструировали из синтетической ДНК из Genscript. Для каждой аминокислоты на каждом шаблоне модели были смоделированы прямые праймеры и обратные праймеры так, чтобы амплификация ПЦР приводила к 5'-продукту ПЦР с вырожденным кодоном NNK и 3'-продукту ПЦР, соответственно. Амплификация «левых» и «правых» продуктов с помощью праймеров COF и COR дала серию продуктов-шаблонов, каждый из которых состоял из вырожденного кодона NNK в отличающемся положении остатка. Для каждой модели эти продукты были объединены в библиотеку SSM. Библиотеки SSM трансформировали электропорацией в кондиционированные клетки *Saccharomyces cerevisiae* штамма EBY100 вместе с линейаризованным вектором pETCON3, используя протокол, ранее описанный Venatuil et al.

Комбинаторные библиотеки конструировали из синтетической ДНК из Genscript, содержащей неопределенные нуклеотиды, и аналогичным образом преобразовывали в линейаризованный вектор pETCON3.

**Экспрессия белка:** гены, кодирующие сконструированные белковые последовательности, были синтезированы и клонированы в плазмидные векторы экспрессии pET-28b(+) *E. coli* (GenScript, N-концевая 6xHis-метка и сайт расщепления тромбином). Затем плазмиды трансформировали в химически компетентные клетки *E. coli* Lemo21 (NEB). Экспрессию белка выполняли с использованием Terrific Broth™ и солей M, культуры выращивали при 37°C до достижения  $OD^{600}$  приблизительно 0,8, затем экспрессию индуцировали 1 mM изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (IPTG), и температуру снижали до 18°C. После экспрессии в течение приблизительно 18 часов клетки собирали и подвергали лизису с помощью микрофлюидизатора Microfluidics M110P при 18000 фунтов на квадратный дюйм, затем растворимую фракцию осветляли центрифугированием при 24000 g в течение 20 минут. Растворимую фракцию очищали методом аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом (Qiagen) с

последующей эксклюзионной хроматографией FPLC (Superdex™ 75 10/300 GL, GE Healthcare). Характеристики очищенного неолекина-2/15 определяли с помощью масс-спектрометрической (МС) проверки молекулярной массы частиц в растворе (Thermo Scientific), эксклюзионной хроматографии с многоугловым детектором рассеяния  
 5 рассеянного света (SEC-MALLS) для проверки мономерного состояния и молекулярной массы (Agilent, Wyatt), SDS-PAGE (электрофореза белков в полиакриламидном геле) и уровней эндотоксина (Charles River).

Компоненты комплекса человеческого и мышиноного IL-2, включая hIL-2 (AK 1-133), hIL-2R $\alpha$  (AK 1-217), hIL-2R $\beta$  (AK 1-214) hIL-2R $\gamma$  (AK 1-232), mIL-2 (AK 1-149), эктодомен  
 10 mIL-2R $\alpha$  (AK 1-213), эктодомен mIL-2R $\beta$  (AK 1-215), и эктодомен m $\gamma$ c (AK 1-233) были секретированы и очищены с использованием бакуловирусной системы экспрессии, как описано ранее<sup>17,49</sup>. Все белки очищали до гомогенности >98% с помощью калибровочной колонки Superdex™ 200 (GE Healthcare), уравновешенной HBS. Чистота была  
 15 подтверждена анализом SDS-PAGE. Для экспрессии биотинилированных субъединиц человеческого рецептора IL-2 и мышиноного рецептора IL-2 белки, содержащие С-концевой пептид акцептора биотина (BAP) - LNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO:303), экспрессировали и очищали, как описано, с помощью Ni-NTA аффинной хроматографии и  
 20 затем биотинилировали с использованием растворимого фермента BirA-лигаза в 0,5 мМ бицина pH 8,3, 100 мМ АТФ, 100 мМ ацетата магния и 500 мМ биотина (Sigma). Избыток биотина удаляли с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex 200, уравновешенной HBS.

**Круговой дихроизм (КД):** снятия спектров КД в дальней ультрафиолетовой области проводили с помощью спектрометра AVIV модели 420 в буфере PBS (pH 7,4) в  
 25 кювете с длиной оптического пути 1 мм с концентрацией белка ~0,20 мг/мл (если иное не указано в тексте). Температура плавления составила от 25 до 95 °С, а сигнал поглощения регистрировали при 222 нм (шаг 2 °С/мин, 30 секунд уравнивания на шаг). Спектры (195-260 нм) снимали при 25 °С и 95 °С, и снова при 25 °С после быстрого рефолдинга (~5 мин).

**Исследования фосфорилирования STAT5:** Исследования *in vitro*:  
 30 приблизительно 210<sup>5</sup> клеток YT-1, IL-2R $\alpha$ <sup>+</sup> YT-1 или CTLL-2 высевали в каждую лунку 96-луночного планшета и повторно суспендировали в полной среде RPMI, содержащей последовательные разведения hIL-2, mIL-2, Super-2 или перестроенных миметиков IL-2. Клетки стимулируют в течение 15 минут при 37°С и немедленно фиксируют путем  
 35 добавления формальдегида до содержания 1,5% и 10-минутной инкубации при комнатной температуре. Пермеабелизация клеток достигается путем повторного суспендирования в

ледяном 100% метаноле в течение 30 минут при 4°C. Фиксированные и пермеабиллизированные клетки дважды промывают буфером для FACS (фосфатно-солевой буфер [ФСБ] pH 7,2, содержащий 0,1% бычьего сывороточного альбумина) и инкубируют с антителом к STAT5 pY694, конъюгированным с Alexa Fluor® 647 (BD Biosciences),

5 разведенным в буфере для FACS, в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем клетки дважды промывают в буфере для FACS и определяют СИФ на проточном цитометре CytoFLEX™ (Beckman-Coulter). Кривые зависимости ответа от дозы аппроксимируют к логистической модели, и полумаксимальную эффективную концентрацию (значения ЭК<sub>50</sub>) рассчитывают с использованием программного

10 обеспечения для анализа данных GraphPad Prism после вычитания средней интенсивности флуоресценции (СИФ) нестимулированных клеток и нормирования к максимальной интенсивности сигнала. Эксперименты проводят с тремя повторами и выполняют трижды со сходными результатами. Исследования *ex vivo*: Селезенки и лимфатические узлы собирают у мышей дикого типа C57BL/6J или B6;129S4-Il2ra<sup>tm1Dw</sup> (CD25KO) и

15 превращают в суспензию отдельных клеток в буфере для сортировки (2% фетальной телячьей сыворотки в фосфатно-солевом буфере с pH 7,2). CD4<sup>+</sup> Т-клетки обогащают посредством отрицательного отбора путем окрашивания клеточной суспензии конъюгированными с биотином антителами к B220, CD8, NK1.1, CD11b, CD11c, Ter119 и CD19 при 1:100 в течение 30 минут на льду. После промывки буфером для сортировки к

20 суспензии клеток добавляют гранулы против биотина MicroBeads™ (Miltenyi Biotec) при 20 мкл на 10<sup>7</sup> общего количества клеток и инкубируют на льду в течение 20 минут. Клетки промывают, повторно суспендируют и затем проводят отрицательный отбор с помощью магнитов EasySep™ (STEMCELL Technologies). Приблизительно 1×10<sup>5</sup> обогащенных клеток добавляют в каждую лунку 96-луночного планшета в полной среде RPMI с 5%

25 ФСТ с 10-кратными последовательными разведениями mIL-2, Super-2 или неoleyкина-2/15. Клетки стимулируют в течение 20 минут при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>, фиксируют 4% ПФА и инкубируют в течение 30 минут при 4°C. После фиксации клетки собирают и дважды промывают буфером для сортировки и снова фиксируют в 500 мкл 90% ледяного метанола в dH<sub>2</sub>O в течение 30 минут на льду для пермеабиллизации. Клетки дважды

30 промывают буфером для пермеабиллизации/промывки (BD Biosciences) и окрашивают антителом к CD4-PerCP в буфере для пермеабиллизации/промывки (1:300), антителом к CD44-Alexa Fluor 700 (1:200), антителом к CD25-PE-Cy7 (1:200) и 5 мкл на образец антитела к pSTAT5-PE pY694 в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте. Клетки промывают буфером для пермеабиллизации/промывки и повторно суспендируют в

35 буфере для сортировки для анализа на проточном цитометре BD LSR II (BD Biosciences).

## Таблицы данных

**Таблица 2: Аминокислотные последовательности двенадцати лучших моделей первого раунда.** Были экспериментально определены характеристики десяти моделей (G1\_neo2\_35-44) по технологии дрожжевого дисплея, и было обнаружено, что все из них, кроме двух (G1\_neo2\_35 и G1\_neo2\_44), связывают флуоресцентно меченый химерный ILR $\beta$ <sub>c</sub> при низких наномолярных концентрациях в скрининге методом проточной цитометрии сконструированных белковых связывающих молекул первого этапа. Указанные модели экспрессировали в дрожжах и инкубировали с 2 нМ hIL-2R $\beta$ <sub>c</sub> или 0 нМ IL-2R $\beta$ <sub>c</sub> (данные не показаны).

Структура	Последовательность
G1_neo2_33	STKKWQLQAЕHALLDWQMALNKSPEPNENLNRAITAAQSWISTGKIDLDKAEDIRRNSDQARREAEKRGIDV RDLISNAQVILLEAR (SEQ ID NO:103)
G1_neo2_34	STKKWQLQAЕHALLDWQMALNKSPEPNENLNRAITAAQSCI STGKCDLDKAEDIRRNSDQARREAEKRGIDV RDLISNAQVILLEAR (SEQ ID NO:104)
G1_neo2_35	STKKWQLQAЕHALLDWQMALNKSPEPNENLNRAITAAQSWISTGKIDCDKAEDIRRNSDQARREAEKRGIDV RDLISNAQVILLEAC (SEQ ID NO:105)
G1_neo2_36	STKKLQLQAЕHFLLDVQMI LNESPENEE LNRAITDAQSWISTGKIDLDRAEELARNLEKVRDEALKRGIDV RDLVSNKVI ALELK (SEQ ID NO:106)
G1_neo2_37	STKKLQLQAЕHFLLDVQMI LNESPENEE LNRCITDAQSWISTGKIDLDRAEECARNLEKVRDEALKRGIDV RDLVSNKVI ALELK (SEQ ID NO:107)
G1_neo2_38	STKKLQLQAЕHFLLDVQMI LNESPENEE LNRAITDAQSCI STGKCDLDRAEELARNLEKVRDEALKRGIDV RDLVSNKVI ALELK (SEQ ID NO:108)
G1_neo2_39	STKKLQLQAЕHFLLDVQMI LNESPENEE LNRAITDAQSWISTGKIDLDRAEELCRNLEKVRDEALKRGIDV RDLVSNACVI ALELK (SEQ ID NO:109)
G1_neo2_40	STKKLQLQAЕHALLDAQMMLNRSPEPNEKLNRI ITTMQSWISTGKIDLDGAKELAKEVEELRQEAЕKRGIDV RDLASNLKVILLELA (SEQ ID NO:110)
G1_neo2_41	STKKLQLQAЕHALLDAQMMLNRSPEPNEKLNRI ITTMQSCI STGKCDLDGAKELAKEVEELRQEAЕKRGIDV RDLASNLKVILLELA (SEQ ID NO:111)
G1_neo2_42	STKKIQLQLEHALLDVQMALNRSPEPNESLNRMITWLQSWISTGKIDLDNAQEMAKEAEKIRKEME KRGIDV RDLISNII VILLELS (SEQ ID NO:112)
G1_neo2_43	STKKIQLQLEHALLDVQMALNRSPEPNESLNRMITWLQSCI STGKCDLDNAQEMAKEAEKIRKEME KRGIDV RDLISNII VILLELS (SEQ ID NO:113)
G1_neo2_44	STKKIQLQLEHALLDVQMALNRSPEPNESLNRMITWLQSWISTGKIDLDNAQEMCKEAEKIRKEME KRGIDV RDLISNICVILLELS (SEQ ID NO:114)

10

**Таблица 3.** Аминокислотные последовательности для экспериментально оптимизированных моделей первого этапа.

Структура	Последовательность
-----------	--------------------

G1_neo2_4 0_1A	STKKTQLLAEHALLDAFMMLNVPEPNEKLNRIITTMQSWIYTGKIDADGAKELAKEVEELEEYKRGIDVEDD ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:115)
G1_neo2_4 0_1B	STKKTQLLAEHALLDAHMLNMLPEPNEKLNRIITTMQSWIHTGKIDGDGAQELAKEVEELEEYKRGIDVEDE ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:116)
G1_neo2_4 0_1C	STKKTQLLAEHALLDAFMMLNMVPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDGAKELAKEVEELEEYKRGIDVEDE ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:117)
G1_neo2_4 0_1D	STKKTQLLAEHALLDALMMLNMVPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQELAKEVEELEEYKRGIDVEDY ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:118)
G1_neo2_4 0_1E	STKKTQLLAEHALLDAHMLNVPEPNEKLNRIITTMQSWIYTGKIDRDGAQELAKEVEELEEYKRGIDVDDD ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:119)
G1_neo2_4 0_1F	STKKTQLLAEHALLDALMMLNLLPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQELAKEVEELEEYKRGIDVEDY ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:120)
G1_neo2_4 0_1G	STKKTQLLAEHALLDAYMMLNMVPEPNEKLNRIITTMQSWILTGKIDSDGAQELAKEVEELEEYKRGIDVDDD ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:121)
G1_neo2_4 0_1H	STKKTQLLAEHALLDAYMMLNMVPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDGAKELAKEVEELEEYKRGIDVDDD ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:122)
G1_neo2_4 0_1I	STKKTQLLAEHALLDAYMMLNLVPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDADGAQELAEVEELEEYKRGIDVDDY ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:123)
G1_neo2_4 0_1J	STKKTQLMAEHALLDAFMMLNVLPPEPNEKLNRIITTMQSWIFTGKIDGDDAQELAKEVEELEEYKRGIDVDDD ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:124)
G1_neo2_4 0_1F_H1	STKKTQLLIEHALLDALDMSRNLPEPNEKLSRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQQLAKEVEELEEYKRGEDVEDE ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:125)
G1_neo2_4 0_1F_H2	STKKTQLLIEHALLDALHMRRNLPEPNEKLSRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQELAKEVEELEEYKRGEDVEDD ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:126)
G1_neo2_4 0_1F_H3	STKKTQLLIEHALLDALNMRKKLPEPNEKLSRIITDMQSWIFTGKIDGDGAQQLAKEVEELEEYKRGEDVEDY ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:127)
G1_neo2_4 0_1F_H4	STKKTQLLIEHALLDALHMSRELPEPNEKLNRIITDMQSWIFTGKIDGDGAQDLAKEVEELEEYKRGEDVEDY ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:128)
G1_neo2_4 0_1F_H5	STKKTQLLIEHALLDALHMSRKLPEPNEKLSRIITTMQSWIFTGKIDGDGAQHLAKEVEELEEYKRGGEVEDE ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:129)
G1_neo2_4 0_1F_H6	STKKTQLLIEHALLDALHMKRKLPEPNEKLNRIITNMQSWIFTEKIDGDGAQDLAKEVEELEEYKRGQDVEDY ASNLKVILLELA (SEQ ID NO:130)
G1_neo2_4 0_1F_M1	STKKTQLAAEHALRDALMLKHLNPEPNEKLARIITTMQSWQFTGKIDGDGAQELAKEVEEELQYKRGIDVEDY ASNLKVILLHLA (SEQ ID NO:131)
G1_neo2_4 0_1F_M2	STKNTQLAAEDALLDALMLRNLNPEPNEKLARIITTMQSWQFTEKIDGDGAQELAKEVEEELQYKRGIDVEDY ASNLKVILLQLA (SEQ ID NO:132)
G1_neo2_4 0_1F_M3	STKKTQLAAEDALRDALMLRNLNPEPNEKLARIITTMQSWQFTEKIDGDGAQELAKEVEEELQYKRGIDVEDY ASNLKVILLQLA (SEQ ID NO:133)

**Таблица 4: Аминокислотные последовательности моделей второго раунда.**

G2\_neo2\_40\_1F\_seq02-G2\_neo2\_40\_1F\_seq28 соответствуют 27 повторным моделям

последовательностей Rosetta™ G1\_neo2\_40\_1F; G2\_neo2\_40\_1F\_seq29-  
G2\_neo2\_40\_1F\_seq42 представляют собой 14 новых моделей миметиков *de novo*.

Структура	Последовательность
G2_neo2_40_1F_seq02	TQKKQQLLAEHALLDALMILNMLKTSSEAVNRMITIAQSWIFTGT'SNPEEAKEMIKMAEQAESEARREGVDTEDYVSNLKVILKEIA (SEQ ID NO:134)
G2_neo2_40_1F_seq03	TTKKYQLLVEHALLDALMMLNLSSSESNKMNRIITTMQSWIFTGT'FDPDQAEELAKLVEELREEFRKRGIDTEDYASNPKVILKELS (SEQ ID NO:135)
G2_neo2_40_1F_seq04	TTKKIQLLVEHALLDALMILNLSSSESNKLNRIITTLQSWIFRGEIDPDRARELAKLLEEIREEMRKRGI DTEDYVSNMIVIIRELA (SEQ ID NO:136)
G2_neo2_40_1F_seq05	TKKKIQLLAEHVLLDLLMMLNLSSSESNKMNRLITIVQSWIFTGTIDPDQAEEMAKWVEELREEFRKRGIDTEDYASNVKILKELS (SEQ ID NO:137)
G2_neo2_40_1F_seq06	TKKKYQLLIEHLLLDALMVLNMSSESNKLNRIITILQSWIFTGTWDPDLAEEMKLMQEI EEELRRRGI DTEDYMSNMRVVIKELS (SEQ ID NO:138)
G2_neo2_40_1F_seq07	TKKKLQLLVEHLLLDMLMILNMSSESNKLNRLITELQSWIFRGEIDPDKAEEMWKIMEEIEKELRREGIDTEDYMSNAKVIKELS (SEQ ID NO:139)
G2_neo2_40_1F_seq08	TSKKQQLLAEHALLDALMILNISSESEAVNRAITWLQSWIFKGT'VNPDQAEEMRKLAEQIREEMRKRGI DTEDYVSNLEVIKELS (SEQ ID NO:140)
G2_neo2_40_1F_seq09	TKKKYQLLIEHLLLDMLMVLNMSSESNKLNRLITWLQSWIFTGT'YDPLAEEMYKILEELREEMRREGIDTEDYMSNMRVIVKELS (SEQ ID NO:141)
G2_neo2_40_1F_seq10	TKKKWQLLIEHLLLDMLMILNLSSESNKLNRLITWLQSWIFTGT'YDPLAEEMKMMDEIEDELREMGIDTEDYMSNAKVIKELS (SEQ ID NO:142)
G2_neo2_40_1F_seq11	TKKKIQLLVEHALLDALMILNLSSSESNKLNRIITTMQSWIFTGTIDPDQAEELSKLVEEIREEMRKRGI DTEDYVSNLKVILDELS (SEQ ID NO:143)
G2_neo2_40_1F_seq12	TEKKLQLLVEHALLDALMILNLWSESNKLNRIITTMQSWIFTGRIDPDKAEELAKLVEELREEARREGIDTEDYVSNLKVILKELS (SEQ ID NO:144)
G2_neo2_40_1F_seq13	TKKKYQLLMEHLLLDMLMVLNMSSESNKLNRLITIIQSWIFTGTWDPDKAEEMAKMLKEIEDELREMGIDTEDYMSNMIVIMKELS (SEQ ID NO:145)
G2_neo2_40_1F_seq14	TTKKIQLLVEHALLDALMLNLSSSESNKMNRIITTMQSWIFEGRIDPDQAEELAKLVEELREEFRKRGIDTEDYVSNLKVILEELS (SEQ ID NO:146)
G2_neo2_40_1F_seq15	TKKKIQLLVEHALLDALMMLNLSSSESNKLNRIITTMQSWIFTGTIDPDQAEELAKLVRELREEFRKRGIDTEDYASNLEVILRELS (SEQ ID NO:147)
G2_neo2_40_1F_seq16	TKKKIQLLVEHALLDALMILNLSSKSNEKLNRIITTMQSWIFNGTIDPDRARELAKLVEEIRDEMEKNGIDTEDYVSNLKVILEELA (SEQ ID NO:148)
G2_neo2_40_1F_seq17	TKKKYQLLIEHVLLDLLMLNLSSSESNKMNRLITILQSWIFTGT'YDPKAEEMAKLLKELREEFRREGIDTEDYISNAIVILKELS (SEQ ID NO:149)
G2_neo2_40_1F_seq18	TKKKIQLLVEHALLDALMMLNLSSSESNKLNRIITTMQSWIFTGTIDPDRAEELAKLVEELREEFRKRGIDTEDYASNPKVILKELS (SEQ ID NO:150)
G2_neo2_40_1F_seq19	TKKKIQLLVEHALLDALMMLNLSSSESNKLNRIITTMQSWIFNGTIDPDQARELAKLVEELREEFRKRGIDTEDYASNPKVILEELA (SEQ ID NO:151)
G2_neo2_40_1F_seq20	TKKKLQLLVEHALLDALMLNLSSSESNKLNRIITTMQSWIFTGT'VDPDQAEELAKLVEEIREELRKRGI DTEDYVSNLKVILKELS (SEQ ID NO:152)

G2_neo2_40_1F_seq21	TTKKYQLLVEHALLDALMILNLSSSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTDFPDQAEELAKLVREIREEMRKRGI DTEDYVSNLEVILRELS (SEQ ID NO:153)
G2_neo2_40_1F_seq22	TKKKIQLLVEHALLDALMILNLSSSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTIDPDRAEELAKLVREIREEMRKRGI DTEDYVSNLEVILRELS (SEQ ID NO:154)
G2_neo2_40_1F_seq23	TKKKYQLLIEHLLLDLLMILNLSSSESNEKLNRLITWLQSWIFRGEWDPDKAEWAKILKEIREELRERGI DTEDYMSNAIVIMKELS (SEQ ID NO:155)
G2_neo2_40_1F_seq24	TDKKLQLLVEHLLLDLLMMLNLSSKSNEKMNRLITIAQSWIFTGKVDPLAREMIKLEETEDENRKNGI DTEDYVSNARVIAKELE (SEQ ID NO:156)
G2_neo2_40_1F_seq25	TKKKIQLLVEHALLDALMLLNLSSESNEKMNRIITTMQSWIFTGTIDPDQAEELAKLVEELKEEFKKRGI DTEDYVSNLKVILKELS (SEQ ID NO:157)
G2_neo2_40_1F_seq26	TKKKYQLLIEHALLDALMILNLWSESNEKLNRIITTMQSWIFTGTYPDKAEELEKLAKIEDEARERGI DTEDYMSNLRVILKELS (SEQ ID NO:158)
G2_neo2_40_1F_seq27	TKKKAQLLAEHALLDALMLLNLSSESNERLNRIITWLQSIIFTGTYPDVMKEAVKLADEIEDEMRRKGI DTEDYVSNLRVILQELA (SEQ ID NO:159)
G2_neo2_40_1F_seq28	TQKKNQLLAEHLLLDALMVLNQSSSESSEVANRIITWAQSWIFEGRVDPNKAEAKKLAKKLEEMRKRGI DMEDYISNMKVIAEEMS (SEQ ID NO:160)
G2_neo2_40_1F_seq29	EDYYSNLKVILEELAREMERNGLSDKAEWRQWKKIVERIRQIRSNNSDLNEAKELLNRLITYIQSQIFE ISERIRETDQEKKEESWKKWQLLEHALLDVLMMLND (SEQ ID NO:161)
G2_neo2_40_1F_seq30	PEKKRQLLLEHILLDALMLLNLEETNPQNTESKFEDYISNAEVIAEELAKLMESLGLSDEAEKFKKIKQW LREVVRIWSSTNWSTLEDKARELLNRIITTIQSQIFY (SEQ ID NO:162)
G2_neo2_40_1F_seq31	PEKKRQLLLEHILLDMLMILNMIETNRENTSEMEDYWSNVRVILRELARLMEELNYKELSELMERMRKI VEKIRQIVTNNSSLDTAREWLNRLITWIQSLIFR (SEQ ID NO:163)
G2_neo2_40_1F_seq32	PEKKRQLLAEHALLDALMLLNIIETNSKNTESEMEDYVSNLEVILTEFKKLAEKLNFSEEAERAERMKRW ARKAYQMMTLDLSLDKAKEMLNRIITILQSIIFN (SEQ ID NO:164)
G2_neo2_40_1F_seq33	PEKKRQLLAEHLLLDVLMMLNGNASLKYASNAQVIADDEFRELARELGLTDEAKKAEKIIEALERAREWL LNNKDKEKAKEALNRAITIAQSWIFN (SEQ ID NO:165)
G2_neo2_40_1F_seq34	PEKKRQLLLEHLLLDLLMILNMLRTNPKNIESDWEDYMSNIEVIIIEELRKIMESLGRSEKAKWKRMKQW VRRILEIVKNSDLEEAKEWLNRLITIVQSEIFE (SEQ ID NO:166)
G2_neo2_40_1F_seq35	WEKKRQLLLEHLLLDLLMILNMWRTPQNTESLMEDYMSNAKVIIEELARMMRSQGLDKAREWEEMKKR IEEIRQIIQNSSKERAKEELNRLITYVQSEIFR (SEQ ID NO:167)
G2_neo2_40_1F_seq36	PKKKIQLLAEHALLDALMILNIVKTNQNAEEKLEDYASNVEVILEEIIARLMESGDQKDEAEKAKRMKEW MKRIKTASEDEQEEMANRIITLLQSWIFS (SEQ ID NO:168)
G2_neo2_40_1F_seq37	PEKKRQLLAEHALLDALMILNLQTNPNQNAEEKLEDYMSNVEVIMEEFARMMRNGDRSEEAENAERIKKW VRKASSTASSEEQREMMNRAITLMQSWIFE (SEQ ID NO:169)
G2_neo2_40_1F_seq38	PEKKRQLLAEHLLLDALMVLNMLTNSKNTEEKLEDYISNMKVIIEKEMIELMRSGLRLEEAKEWKEALKA VEKIGSRMDSETARELANRIITLAQSAIFY (SEQ ID NO:170)
G2_neo2_40_1F_seq39	PEKKRQLLAEHALLDALMFLNLIVETNPQAEKIEDYASNLRVIAEELARLFENLGRLEDEAQKAKDIKEL AERARSRVSSSEKRKEAMNRAITILQSMIFR (SEQ ID NO:171)
G2_neo2_40_1F_seq40	PEKKRQLLAEHALLDALMILNIIRTNSDNTESEKLEDYISNLKVILEEIIARLMESLGLSDEAEKAKEAMRL ADKAGSTASEEEKKEAMNRAITWAQSWIFN (SEQ ID NO:172)
G2_neo2_40_1F_seq41	PEKKRQLLAEHALLDALMMLNIIIRTPDQNAEEKLEDYWSNLVILREIAKLMESLGLTDEAEKAKEAARW AEEARTTASKDQRRELANRIITLLQSWIFS (SEQ ID NO:173)

G2_neo2_40_1F_seq42	PEKKRQLLAEHL LLDALMILNIIETNEQNAESKLEDYISNAKVLDEFREMARDLGLLDEAKKAEMKRWLEKMRSNASSDERREWANRMITTAQSWIFN (SEQ ID NO:174)
---------------------	---

**Таблица 5.** Аминокислотные последовательности для экспериментально оптимизированных моделей второго этапа.

Структура	Последовательность
G2_neo2_40_1F_seq27_s18	TNKEAQLHAEFALYDALMLLNLSSESNERLNRIITWLSIIFYETYDPDMVKEAVKLADEIEDEMRKRKIDTEDYVVNLRLILQELA (SEQ ID NO:175)
G2_neo2_40_1F_seq27_s22	TKKDAELLAEFALYDALMLLNLSSESNERLNEIITWLSIIFYGTYPDMVKEAVKLADEIEDEMRKRGIDTEDYVSNLRLILQELA (SEQ ID NO:176)
G2_neo2_40_1F_seq27_s24	TNKAQLHAEFALYDALMLLNLSSESNERLNDIITWLSIIFTGTYPDMVKEAVKLADEIEDEMRKRKIDTEDYVVNLRYILQELA (SEQ ID NO:177)
G2_neo2_40_1F_seq29_s6	EDYYSNLKLI LEEELAREMERNGLSDKAEWRQWKIVERIRQIRSNNSDLNEAKELLNRLITYIQSQIFEVLHGVGETDQEKKEESWKKWDLLEHALLDVLMMLND (SEQ ID NO:178)
G2_neo2_40_1F_seq29_s7	EDYYSNLKVI LEEELAREMERNGLSDKAEWRQWKIVERIRQIRSNNSDLNEAKELLNELITYIQSQIFEVIEREGETDQEKKEESWKKWELHLEHALLDVLMMLND (SEQ ID NO:179)
G2_neo2_40_1F_seq29_s8	EDYYSNLKLI LEEELAREMERNGLSDKAEWRQWKIVERIRQIRSNNSDLNEAKELLNRLITYIQSQIFEVLEGVGETDQEKKEESWKKWELHLEHALLDVLMMLND (SEQ ID NO:180)
<b>Неолейкин-2/15</b> (т. е. G2_neo2_40_1F_seq36_s11)	PKKKIQLHAENALYDALMILNIVKTNSPPAEEKLEDYAFNFELILEE IARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKT TASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:181)
G2_neo2_40_1F_seq36_s12	PKKKIQLLAENALFDLLMILNIVKTN SQNAEEKLEDYAYNAGVILEE IARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKDTASEDEQEEMANEIITILQSWNFS (SEQ ID NO:182)

5

Неолейкин-2/15-Н8У-К33Е: H1->H3->H2'->H4  
 PKKKIQLYAENALYDALMILNIVKTNSPPAEEKLEDYAFNFELILEE IARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKT TASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:94)

- 10 Связывание неолейкина-2/15-Н8У-К33Е с рецептором IL2 было измерено с помощью биослойной интерферометрии, и было обнаружено, что он имеет более высокую аффинность связывания, чем аффинность связывания неолейкина-2 с IL2-R-бета, как при тестировании только против IL2R-бета, так и при тестировании против комплекса IL2R-бета-гамма. Это повышенная аффинность была в основном обусловлена улучшенной
- 15 скоростью диссоциации из IL2-R-бета.

**Таблица 6.** Аминокислотные последовательности для моделей миметиков интерлейкина-4, основанные на перестройке неолейкина-2/15.

Структура	Последовательность
-----------	--------------------

IL4_G2_neo2_40_1F_se q36_S11	PKKKIQITAEELKDALSLNIVKTNSPPAEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGDQKDEAE KAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:183)
<b>Неолейкин-4</b> (то есть IL4_G2_neo2_40_1F_se q36_S11_MIF)	PKKKIQIMAEELKDALSLNIVKTNSPPAEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGDQKDEAE KAKRMIEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:184)

## Пример 2: Расщепленные миметики цитокинов для нацеленной иммунотерапии

5 Белки de novo моделируют в соответствии с правилами идеальной белковой структуры, придающей им нехарактерные биохимические свойства, такие как экстремальная термостабильность и мутационная устойчивость. Таким образом, белки, сконструированные de novo, являются идеальными кандидатами для использования при разработке условно активных белковых терапевтических средств. В настоящей заявке мы

10 сообщаем о разработке расщепленных миметиков цитокинов для высоконацеленной иммунотерапии на основе недавно разработанного сконструированного de novo белка-миметика IL-2, неолейкина-2/15. Эта система обеспечивает доставку условно активных терапевтических белков, которые восстанавливают свою активность путем совместной локализации на поверхности клеток-мишеней. Мы идентифицировали потенциальные

15 сайты расщепления и продемонстрировали успешное восстановление активности неолейкина-2/15 путем связывания с рецепторами IL-2, передачи клеточных сигналов и зависимой от совместной локализации активации на поверхности опухолевых клеток-мишеней. Мы также демонстрируем это приложение в отношении другого сконструированного de novo миметика цитокина, неолейкина-4.

20 Чтобы идентифицировать потенциальные сайты расщепления неолейкина-2/15 (Neo2), мы оценили структуру белка, чтобы найти положения расщепления, которые смогут минимизировать вредные эффекты на функцию белка. В результате мы определили три примерных положения расщепления: (i) между спиральными элементами N1 (Neo2A1) и N3'-N2-N4 (Neo2B1), (ii) между спиральными элементами N1-N3' (Neo2A2) и N2-N4 (Neo2B2), (iii) между спиральными элементами N1-N3'-N2 (Neo2A3) и N4 (Neo2B3) (Фиг. 15). Фрагменты расщепленного Neo2 были охарактеризованы путем анализа их способности связываться с человеческим рецептором IL-2 (Фиг. 15) и передачи сигналов на IL-2-чувствительных клетках CTTL-2 (Фиг. 16). Было показано, что отдельные расщепленные фрагменты в большинстве случаев обладают незначительным

25 связыванием с IL-2R $\beta$  и сигнальной способностью, но сильной активностью при эквимольном объединении комплементарных расщепленных фрагментов.

30

Разработка расщепленного Neo2 делает возможным зависящее от совместной локализации восстановление белка и, таким образом, условную активацию расщепленного Neo2. Чтобы обеспечить совместную локализацию фрагментов Neo2A и Neo2B, мы сначала выполнили генетические слияния с нацеливающими доменами (Фиг. 17). Neo2A1, Neo2A2 и Neo2A3 сливали с С-концом Her2-нацеленного сконструированного белка с анкириновым повтором (DARPin) с помощью гибкого линкера из 15 остатков (GSGGSGGGSGGSGSG; SEQ ID NO:100). Neo2B1, Neo2B2 и Neo2B3 сливали с N-концом EGFR-нацеленного сконструированного белка с анкириновым повтором (DARPin) с помощью гибкого линкера из 15 остатков (GSGGSGGGSGGSGSG; SEQ ID NO:100). Затем мы оценили их способность восстанавливать связывание с IL-2R $\beta$ γ после объединения расщепленных фрагментов, демонстрируя, что слияния не нарушают их способность к восстановлению расщепленного Neo-2 (Фиг. 17).

Чтобы оценить зависящую от совместной локализации активацию и селективность нацеливания системы расщепленного Neo2, мы выполнили анализ *in vitro* с использованием расщепленного Neo-2/15, нацеленного на EGFR и Her2 (Фиг. 18a), на поверхности модифицированных линий клеток K562. Мы использовали четыре модифицированные линии клеток: (i) без поверхностных рецепторов, (ii) Her2<sup>+</sup>/eGFP<sup>+</sup>, (iii) EGFR<sup>+</sup>/iRFP<sup>+</sup>, (iv) Her2<sup>+</sup>/eGFP<sup>+</sup> EGFR<sup>+</sup>/iRFP<sup>+</sup> (Фигура 18b). Четыре линии клеток смешивали в эквивалентных соотношениях и инкубировали с нацеленными фрагментами расщепленного Neo2 в течение 15 минут. Затем клетки промывали и инкубировали со смесью биотинилированного рецептора IL-2 и флуоресцентного конъюгата стрептавидин-фикоэритрин (SAPE). Наконец, клетки анализировали с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Успешное восстановление активности Neo-2 привело к флуоресцентному мечению ФЭ на поверхности клеток-мишеней (Фиг. 18c). Мы наблюдали сильное связывание рецептора IL-2 на поверхности Her2<sup>+</sup> и Her2<sup>+</sup>/EGFR<sup>+</sup>, когда полный Neo2 был нацелен с помощью одного нацеливающего домена против Her2 (aHer2-Neo2). Подобное связывание наблюдалось, когда расщепленные фрагменты Neo2A1 и Neo2B1 были оба нацелены на Her2 (aHer2-Neo2A1 + aHer2-Neo2B1), это демонстрирует, что при необходимости оба фрагмента могут быть доставлены к одному и тому же маркеру клеточной поверхности. Кроме того, мы наблюдали высокоселективное восстановление на поверхности двойных положительных клеток Her2<sup>+</sup>/EGFR<sup>+</sup>, когда каждый расщепленный фрагмент был нацелен либо на Her2, либо на EGFR (aHer2-Neo2A1 + Neo2B1-aEGFR, aHer2-Neo2A2 + Neo2B2-aEGFR, aHer2-Neo2A3 + Neo2B3-aEGFR). Дальнейшие исследования продемонстрировали, что для каждой комбинации фрагментов расщепленного Neo2 одновременное присутствие обоих фрагментов было необходимо,

чтобы обеспечить привлечение рецептора IL-2 на поверхности клеток K562 (Фиг. 19). Эти результаты демонстрируют высокую селективность расщепленных миметиков цитокинов для восстановления целевой активности конкретно на поверхности клеток-мишеней.

Приложения технологии расщепленных миметиков цитокинов не ограничиваются только нацеливанием на антигены, ассоциированные с опухолью. Для данных приложений нацеливание на конкретные подгруппы иммунных клеток, которые должны быть селективно стимулированы, будет благоприятным для направления иммунного ответа для лечения заболевания. Например, это приложение можно применять для специфичного усиления размножения цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, естественных киллерных клеток или модифицированных CAR Т-клеток для усиления их противоопухолевого ответа, а также для нацеливания на Т-регуляторные клетки для подавления сильного иммунного ответа (Фиг. 20а). Кроме того, в некоторых сценариях могут применяться смешанные подходы к нацеливанию, т. е. нацеливание одного расщепленного фрагмента на опухолевые клетки или микроокружение опухоли, в то время как другой фрагмент доставляют к иммунным клеткам (Фиг. 20b)

Наконец, чтобы продемонстрировать переносимость методологии, описанной в настоящей заявке, на другие интерлейкины, сконструированные de novo, мы создали новый условно активный миметик IL-4 (Фиг. 21). Для этого мы успешно ввели специфические мутации на расщепленный Neo-2, которые модифицируют поверхность связывания с рецептором hIL-2-бета, для связывания рецептора hIL-4-альфа.

### **Примерные последовательности вариантов расщепленного неолейкина-2/15, использованные в Примере 2**

25 H1 (Neo2A1) PKKKIQLHAENHALYDALMILNIVKTNS (SEQ ID NO:256)

H3-H2'-H4 Neo2B1)

TNSPPAEKLEDYAFNLFELILEEIIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMAN  
AIITILQSWIFS (SEQ ID NO:257)

30 H1-H3-H2' Neo2A3  
PKKKIQLHAENHALYDALMILNIVKTNSPPAEKLEDYAFNLFELILEEIIARLFESGDQKDEAEKA  
KRMKEWMKRIKTAS (SEQ ID NO:258)

35 H4 (Neo2B3) TTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:259)

H1-H3 (Neo2A2)

PKKKIQLHAENHALYDALMILNIVKTNSPPAEKLEDYAFNLFELILEEIIARLFESGD (SEQ ID  
NO:260)

40 H2'-H4 (Neo2B2) DQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS  
(SEQ ID NO:261)

**Примерные последовательности расщепленного неoleyкина-4, использованные в Примере 2**

5 H1 Neo4A1) PKKKIQIMAEALKDALSILNIVKTNS (SEQ ID NO:262)

H3-H2'-H4 (также известный как Neo4B1)

TNSPPAEQLERFAKRFRNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMIEWMKRIKTTASEDEQEEMAN  
AIITILQSWFFS (SEQ ID NO:263)

10

**Примерные конструкции, использованные в Примере 2**

X2-Z1-X3-Z2-X4-E01\_EGFR\_DARPin

(MGSHHHHHHGSGSENLYFQGS~~GGG~~) TNSPPAEKLEDYAFNFELILEE IARLFESGDQKDEAE  
15 KAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (GSGGSGGGSGGSGGSGGG) DLGK  
KLEAARAGQDDEVRI LMANGADVNAADDTWGWTPHLHAAAYQGHLEIVEVLLKNGADVNAIDYIG  
WTPHLAADGHLEIVEVLLKNGADVNASDYIGDTPLHLAAHNGHLEIVEVLLKHGADVNAQDKF  
GKTAFDISIDNGNEDLAEILQKLN  
(SEQ ID NO:304)

20

G3\_Her2\_DARPin\_X1

(MGSHHHHHHGSGSENLYFQGS~~GSG~~) DLGKKLEAARAGQDDEVRI LMANGADVNAKDEYGLTP  
LYLATAHGHLEIVEVLLKNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGK  
TAFDISIGNGNEDLAEILQKLN (GSGGSGGGSGGSGSG) PKKKIQLHAEHALYDALMILNIVKT  
25 NS (SEQ ID NO:305)

G3\_Her2\_DARPin\_X2-Z1-X3-Z3-X4

(MGSHHHHHHGSGSENLYFQGS~~GSG~~) DLGKKLEAARAGQDDEVRI LMANGADVNAKDEYGLTP  
LYLATAHGHLEIVEVLLKNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGK  
30 TAFDISIGNGNEDLAEILQKLN (GSGGSGGGSGGSGSG) TNSPPAEKLEDYAFNFELILEEIA  
RLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID  
NO:306)

X2-Z1-X3-Z2-X4-E01\_EGFR\_DARPin

(MGSHHHHHHGSGSENLYFQGS~~GGG~~) TNSPPAEKLEDYAFNFELILEE IARLFESGDQKDEAE  
35 KAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (GSGGSGGGSGGSGGSGGG) DLGK  
KLEAARAGQDDEVRI LMANGADVNAADDTWGWTPHLHAAAYQGHLEIVEVLLKNGADVNAIDYIG  
WTPHLAADGHLEIVEVLLKNGADVNASDYIGDTPLHLAAHNGHLEIVEVLLKHGADVNAQDKF  
GKTAFDISIDNGNEDLAEILQKLN

(SEQ ID NO:307)

X2-Z2-X4-E01\_EGFR\_DARPin

**(MGSHHHHHHGSGSENLYFQGS GGG)** DQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITI  
 5 LQSWIFS **(GSGSGGGSGSGSGSGSGGG)** DLGKKLLEAARAGQDDEVRI LMANGADV NADDTWG  
 WTPLHLAAYQGHLEIVEVLLKNGADV NAYDYIGWTPHLAADGHLEIVEVLLKNGADV NASDYI  
 GDTPLHLAAHNGHLEIVEVLLKHGADV NAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEILQKLN (SEQ  
 ID NO:308)

10 X4-E01\_EGFR\_DARPin

**(MGSHHHHHHGSGSENLYFQGS GGG)** TTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS **(GSGSGGGSGGS  
 GSGSGGG)** DLGKKLLEAARAGQDDEVRI LMANGADV NADDTWGWTPHLAAYQGHLEIVEVLL  
 KNGADV NAYDYIGWTPHLAADGHLEIVEVLLKNGADV NASDYIGDTPLHLAAHNGHLEIVEVL  
 LKHGADV NAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEILQKLN (SEQ ID NO:309)

15

G3\_Her2\_DARPin\_X1-Z1-X3

**(MGSHHHHHHGSGSENLYFQGS GSG)** DLGKKLLEAARAGQDDEVRI LMANGADV NAKDEYGLTP  
 LYLATAHGHLEIVEVLLKNGADV NAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADV NAQDKFGK  
 TAFDISIGNGNEDLAEILQKLN **(GSGSGGGSGSGSGSG)** PKKKIQLHAEHALYDALMILNIVKT  
 20 NSPPAEKLEDYAFNFELEIARLFESG (SEQ ID NO:310)

G3\_Her2\_DARPin\_X1-Z1-X3-Z2-X2

**(MGSHHHHHHGSGSENLYFQGS GSG)** DLGKKLLEAARAGQDDEVRI LMANGADV NAKDEYGLTP  
 LYLATAHGHLEIVEVLLKNGADV NAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADV NAQDKFGK  
 25 TAFDISIGNGNEDLAEILQKLN **(GSGSGGGSGSGSGSG)** PKKKIQLHAEHALYDALMILNIVKT  
 NSPPAEKLEDYAFNFELEIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTA (SEQ ID  
 NO:311)

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Неприродный условно активный агонист рецептора, содержащий первый полипептидный компонент и второй полипептидный компонент, причем указанные  
 5 первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный компонент не присутствуют в слитом белке, при этом в целом указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный компонент содержат домены X1, X2, X3 и X4, где:

a) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную  
 10 последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4);

(b) X2 представляет собой любой спиральный пептидный домен;

(c) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную  
 15 последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (LE)DYAFNFELLEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5); и

(d) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную  
 20 последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6).

при этом:

(i) аминокислотные остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать;

25 (ii) указанный первый полипептидный компонент содержит по меньшей мере один из X1, X2, X3 и X4, но не содержит каждый из X1, X2, X3 и X4; и

(iii) указанный второй полипептидный компонент содержит каждый из X1, X2, X3 и X4, который не присутствует в указанном первом полипептидном компоненте;

30 при этом указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный компонент не являются активными агонистами рецептора по отдельности, и при этом указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептид взаимодействуют с образованием активного агониста гетеродимера  $\beta_c$  рецептора IL-2 (IL-2R $\beta_c$ ), гетеродимера  $\alpha_c$  рецептора IL-4 (IL-4R $\alpha_c$ ), IL-13 альфа или гетеродимера IL-4Rальфа/IL13Rальфа.  
 35

2. Условно активный агонист рецептора по п. 1, отличающийся тем, что:

a) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична полной длине пептида

5 (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4) или

(PKKKI)QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4);

(b) X2 представляет собой любой спиральный пептидный домен;

(c) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична полной длине пептида

10 (LE)DYAFNFELLILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELLILEEIARLFES(G)

(SEQ ID NO:5); и

(d) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична полной длине пептида

(E)DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или (E)DEQEEMANAIITILQSWIFS

15 (SEQ ID NO:6).

3. Условно активный агонист рецептора по п. 1, отличающийся тем, что:

a) X1 представляет собой пептид, имеющий аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична полной длине пептида

20 (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4) или

(PKKKI)QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4);

(b) X2 представляет собой любой спиральный пептидный домен;

(c) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична полной длине пептида

25 (LE)DYAFNFELLILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELLILEEIARLFES(G)

(SEQ ID NO:5); и

(d) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична полной длине пептида

(E)DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или (E)DEQEEMANAIITILQSWIFS

30 (SEQ ID NO:6).

4. Условно активный агонист рецептора по п. 1, отличающийся тем, что:

a) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, идентичную полной длине пептида

(PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI) LHAEHALYDAL(MILNI) (SEQ ID NO:4) или (PKKKI)QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4);

(b) X2 представляет собой любой спиральный пептидный домен;

(c) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

5 последовательность, идентичную полной длине пептида

(LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES(G) (SEQ ID NO:5); и

(d) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, идентичную полной длине пептида (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S)

10 (SEQ ID NO:6) или (E)DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6).

5. Условно активный агонист рецептора по п. 1, отличающийся тем, что:

a) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%,

15 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4);

(b) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%,

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине

20 пептида LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5); и

(c) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%,

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине

пептида EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6).

25

6. Условно активный агонист рецептора по п. 1, отличающийся тем, что:

a) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 65% идентична полной длине пептида

PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID

30 NO:320);

(b) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 65% идентична полной длине пептида

LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID

NO:321); и

(c) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65% идентична полной длине пептида EDEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:322).

5

7. Условно активный агонист рецептора по п. 1, отличающийся тем, что:

a) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична полной длине пептида PKKKIQLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:320);

10

(b) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична полной длине пептида LEDYAFNFELILEEИARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEИARLFES (SEQ ID NO:321); и

15

(c) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична полной длине пептида EDEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:322).

20

8. Условно активный агонист рецептора по п. 1, отличающийся тем, что:

a) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична полной длине пептида PKKKIQLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:320);

25

(b) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична полной длине пептида LEDYAFNFELILEEИARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEИARLFES (SEQ ID NO:321); и

30

(c) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична полной длине пептида EDEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:322).

9. Условно активный агонист рецептора по п. 1, отличающийся тем, что:

- a) X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична полной длине пептида PKKKIQLHAEENALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAEENALYDALMILNI (SEQ ID NO:320);
- 5 (b) X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична полной длине пептида LEDYAFNFELLILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELLILEEIARLFES (SEQ ID NO:321); и
- (c) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична полной длине пептида EDEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:322).
- 10 10. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, 15 что X2 имеет длину по меньшей мере 8 аминокислот;
11. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что:
- X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, 20 которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7), причем аминокислотные остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать.
- 25 12. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что:
- (i) X1 включает 1, 2, 3, 4 или все 5 из перечисленных далее: L в остатке 7, H в остатке 8, H в остатке 11, Y в остатке 14; M в остатке 18, при этом указанная нумерация относится к SEQ ID NO:4 на основании присутствия необязательных остатков; и/или
- 30 (ii) X3 включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все 8 из перечисленных далее: D в остатке 3, Y в остатке 4, F в остатке 6, N в остатке 7, L в остатке 10, I в остатке 11, E в остатке 13 или E в остатке 14, при этом указанная нумерация относится к SEQ ID NO:5 на основании присутствия необязательных остатков.

13. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что:

(iii) X4 включает I в остатке 19, причем указанная нумерация относится к SEQ ID NO:6 на основании присутствия необязательных остатков.

5

14. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что:

X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична по своей длине пептиду  
PKKKIQIMAEELKDALNILNI (SEQ ID NO:8);

10

X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 37%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или на 100% идентична по своей длине пептиду

15 LERFAKRFERNLWGIARLFESG (SEQ ID NO:9); и

X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична по своей длине пептиду  
EDEQEEMANAHTILQSWFFS (SEQ ID NO:10).

20

где

(i) X1 включает I в остатке 7, T или M в остатке 8, E в остатке 11, K в остатке 14 и S в остатке 18; и

(ii) X3 включает R в остатке 3, F в остатке 4, K в остатке 6, R в остатке 7, R в остатке 10, N в остатке 11, W в остатке 13 и G в остатке 14.

25

15. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что:

X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65% идентична по своей длине пептиду

30 PKKKIQIMAEELKDALNILNI (SEQ ID NO:8);

X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65% идентична по своей длине пептиду

LERFAKRFERNLWGIARLFESG (SEQ ID NO:9); и

X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65% идентична по своей длине пептиду

EDEQEEMANAИТИЛQSWFFS (SEQ ID NO:10),

где

5 (i) X1 включает I в остатке 7, T или M в остатке 8, E в остатке 11, K в остатке 14 и S в остатке 18; и

(ii) X3 включает R в остатке 3, F в остатке 4, K в остатке 6, R в остатке 7, R в остатке 10, N в остатке 11, W в остатке 13 и G в остатке 14.

10 16. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что:

X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична по своей длине пептиду

PKKKIQIMAEELKDALNILNI (SEQ ID NO:8);

15 X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична по своей длине пептиду

LERFAKRFERNLWGIARLFESG (SEQ ID NO:9); и

X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична по своей длине пептиду

20 EDEQEEMANAИТИЛQSWFFS (SEQ ID NO:10).

где

(i) X1 включает I в остатке 7, T или M в остатке 8, E в остатке 11, K в остатке 14 и S в остатке 18; и

(ii) X3 включает R в остатке 3, F в остатке 4, K в остатке 6, R в остатке 7, R в остатке 10, N в остатке 11, W в остатке 13 и G в остатке 14.

17. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что:

30 X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична по своей длине пептиду

PKKKIQIMAEELKDALNILNI (SEQ ID NO:8);

X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична по своей длине пептиду

LERFAKRFERNLWGIARLFESG (SEQ ID NO:9); и

X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична по своей длине пептиду

EDEQEEMANA**PTILQSWFFS** (SEQ ID NO:10).

где

5 (i) X1 включает I в остатке 7, T или M в остатке 8, E в остатке 11, K в остатке 14 и S в остатке 18; и

(ii) X3 включает R в остатке 3, F в остатке 4, K в остатке 6, R в остатке 7, R в остатке 10, N в остатке 11, W в остатке 13 и G в остатке 14.

10 18. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что:

X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична по своей длине пептиду

PKKKIQIMAE**EALKDALSILNI** (SEQ ID NO:8);

15 X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична по своей длине пептиду

LER**FAKRFERNLWGIARLFESG** (SEQ ID NO:9); и

X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична по своей длине пептиду

20 EDEQEEMANA**PTILQSWFFS** (SEQ ID NO:10).

где

(i) X1 включает I в остатке 7, T или M в остатке 8, E в остатке 11, K в остатке 14 и S в остатке 18; и

(ii) X3 включает R в остатке 3, F в остатке 4, K в остатке 6, R в остатке 7, R в остатке 10, N в остатке 11, W в остатке 13 и G в остатке 14.

19. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 14-18, отличающийся тем, что

(iii) X4 включает F в остатке 19.

30 20. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что аминокислотные замены (AA) относительно референсных пептидных доменов присутствуют не более чем в 3 остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 2 остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом, или

присутствуют не более чем в 1 остатке аминокислоты, выделенном жирным шрифтом, или не присутствуют в остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом.

21. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что аминокислотные замены относительно референсных пептидных доменов представляют собой консервативные аминокислотные замены.

22. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что аминокислотные остатки относительно SEQ ID NO:4 выбраны из группы, состоящей из:

	Положение 01:	A	F	I	L	M	P	Q	R	S	W
	Положение 02:	A	D	E	G	V	K				
	Положение 03:	D	E	F	W	K					
	Положение 04:	D	E	K	N	P	R	W			
15	Положение 05:	D	E	H	I	K	L	M	S		
	Положение 06:	A	D	E	G	L	P	S	W	Q	
	Положение 07:	D	E	L	Q	Y	I				
	Положение 08:	A	F	H	W	Y	M	T			
	Положение 09:	C	F	P	A						
20	Положение 10:	C	D	E	F	K	P				
	Положение 11:	D	F	H	E						
	Положение 12:	A	D	E	P	S	T	V			
	Положение 13:	H	I	L	M	P	R	V	W		
	Положение 14:	F	R	W	Y	K					
25	Положение 15:	D	E	N	Y						
	Положение 16:	A	C	L	M	S					
	Положение 17:	F	I	L	M	P	R				
	Положение 18:	G	M	Q	Y	S					
	Положение 19:	I	L	M	P	Q	V				
30	Положение 20:	A	K	L	M	Q	R	S			
	Положение 21:	G	K	N	P	R	S	W			
	Положение 22:	D	E	I	K	M	N	W	Y		

23. Условно активный агонист рецептора по п. 22, отличающийся тем, что положение 7 представляет собой I, положение 8 представляет собой M или T, положение 11

представляет собой E, положение 14 представляет собой K и положение 18 представляет собой S.

24. Условно активный агонист рецептора по п. 22, отличающийся тем, что 1, 2, 3, 4 или 5 из перечисленных далее утверждений не являются истинными: положение 7 представляет собой I, положение 8 представляет собой M или T, положение 11 представляет собой E, положение 14 представляет собой K и положение 18 представляет собой S.

25. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что аминокислотные остатки относительно SEQ ID NO:5 выбраны из группы, состоящей из:

	Положение 01:	A	L										
	Положение 02:	D	E	G	K	M	T						
15	Положение 03:	D	E	N	Y	R							
	Положение 04:	C	D	G	T	Y	F						
	Положение 05:	A	F	H	S	V	W	Y					
	Положение 06:	A	F	I	M	T	V	Y	K				
	Положение 07:	D	K	N	S	T	R						
20	Положение 08:	A	C	G	L	M	S	V	F				
	Положение 09:	C	H	K	L	R	S	T	V	E			
	Положение 10:	F	I	L	M	Y	R						
	Положение 11:	I	L	N	T	Y							
	Положение 12:	F	K	L	M	S	V						
25	Положение 13:	A	D	F	G	I	N	P	Q	S	T	E	W
	Положение 14:	A	E	F	G	H	S	V					
	Положение 15:	C	I	L	M	V	W						
	Положение 16:	A	D	G	S	T	V						
	Положение 17:	H	K	L	N	R							
30	Положение 18:	C	D	G	I	L	Q	R	T	W			
	Положение 19:	D	F	M	N	W							
	Положение 20:	A	C	E	F	G	M	S	Y				
	Положение 21:	D	E	G	H	L	M	R	S	T	V		
		W											
35	Положение 22:	A	D	G	K	N	S	Y					

26. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-25, содержащий замену цистеина в положении 17 или 20 относительно SEQ ID NO:5.

5 27. Условно активный агонист рецептора по п. 25 или 26, отличающийся тем, что положение 3 представляет собой R, положение 4 представляет собой F, положение 6 представляет собой K, положение 7 представляет собой R, положение 10 представляет собой R, положение 11 представляет собой N, положение 13 представляет собой W и положение 14 представляет собой G.

10 28. Условно активный агонист рецептора по п. 25 или 26, отличающийся тем, что 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все 8 из перечисленных далее утверждений не являются истинными: положение 3 представляет собой R, положение 4 представляет собой F, положение 6 представляет собой K, положение 7 представляет собой R, положение 10 представляет собой R, положение 11 представляет собой N, положение 13 представляет собой W и  
15 положение 14 представляет собой G.

29. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что аминокислотные остатки относительно SEQ ID NO:6 выбраны из группы, состоящей  
20 из:

	Положение 01:	D	E	G	K	V				
	Положение 02:	D	I	M	S					
	Положение 03:	E	G	H	K					
	Положение 04:	E	G	I	K	Q	R	S		
25	Положение 05:	A	D	E	G	H	S	V		
	Положение 06:	C	D	E	G	I	M	Q	R	T
	Положение 07:	C	E	L	M	P	R	T		
	Положение 08:	A	F	L	M	W				
	Положение 09:	A	G	L	N	Q	R	T		
30	Положение 10:	A	C	D	E	F	H	I	W	
	Положение 11:	I	M	N	S	V	W			
	Положение 12:	I	K	L	S	V				
	Положение 13:	C	L	M	R	S	T			
	Положение 14:	I	L	P	T	Y				
35	Положение 15:	F	G	I	L	M	N	V		

	Положение 16:	H	K	Q	R				
	Положение 17:	C	F	K	S	W	Y		
	Положение 18:	K	Q	T	W				
	Положение 19:	C	G	N	I				
5	Положение 20:	C	F	G	L	Y			
	Положение 21:	A	F	G	H	S	Y		

30. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-29, содержащий замену цистеина в положении 3 относительно SEQ NO: 6.

10

31. Условно активный агонист рецептора по п. 30 или 31, отличающийся тем, что положение 19 представляет собой I.

32. Условно активный агонист рецептора по п. 30 или 31, отличающийся тем, что положение 19 не является I.

15

33. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-32, отличающийся тем, что X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична по своей длине KDEAEKAKRMKEWMKRIKT (SEQ ID NO:7).

20

34. Условно активный агонист рецептора по п. 11 или 33, отличающийся тем, что аминокислотные остатки относительно SEQ ID NO:7 выбраны из группы, состоящей из:

25	Положение 01:	A	H	L	M	R	S	V	K	
	Положение 02:	A	D	E	Q	R	S	T	V	W Y
	Положение 03:	C	E	G	K	L	N	Q	R	W
	Положение 04:	A	F	G	N	S	T	V	Y	
	Положение 05:	A	E	G	I	M	R	V		
30	Положение 06:	C	E	K	L	N	R	V		
	Положение 07:	A	C	E	I	L	S	T	V	W
	Положение 08:	H	K	L	M	S	T	W	Y	
	Положение 09:	A	I	L	M	Q	S	R		
	Положение 10:	A	I	M	S	W	Y			
35	Положение 11:	C	I	K	L	S	V			

Положение 12:	C	E	K	L	P	Q	R	T		
Положение 13:	A	D	H	N	W					
Положение 14:	A	C	G	I	L	S	T	V	M	
Положение 15:	A	E	G	I	K	L	M	R	V	
5 Положение 16:	G	H	L	R	S	T	V			
Положение 17:	A	I	L	V						
Положение 18:	A	C	D	E	G	H	I	K	M	S
Положение 19:	D	E	G	L	N	V	T			

10 35. Условно активный агонист рецептора по пп. 11, 33 или 34, содержащий замену цистеина в положении 1, 2, 5, 9, 12 или 16 относительно SEQ NO: 7.

36. Условно активный агонист рецептора по п. 34 или 35, отличающийся тем, что положение 11 представляет собой I.

15

37. Условно активный агонист рецептора по п. 34 или 35, отличающийся тем, что положение 11 не является I.

38. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-37, отличающийся тем, что:

(i) указанный первый полипептидный компонент содержит один из X1, X2, X3 и X4, и указанный второй полипептидный компонент содержит три из X1, X2, X3 и X4, которые не присутствуют в указанном первом полипептидном компоненте; или

(ii) указанный первый полипептидный компонент содержит два из X1, X2, X3 и X4, и указанный второй полипептидный компонент содержит два из X1, X2, X3 и X4, которые не присутствуют в указанном первом полипептидном компоненте.

39. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-37, отличающийся тем, что

(i) указанный первый полипептид содержит X1, и указанный второй полипептид содержит X2, X3 и X4;

(ii) указанный первый полипептид содержит X2, и указанный второй полипептид содержит X1, X3 и X4;

(iii) указанный первый полипептид содержит X3, и указанный второй полипептид содержит X1, X2 и X4;

- (iv) указанный первый полипептид содержит X4, и указанный второй полипептид содержит X1, X2 и X3;
- (v) указанный первый полипептид содержит X1 и X2, и указанный второй полипептид содержит X3 и X4;
- 5 (vi) указанный первый полипептид содержит X1 и X3, и указанный второй полипептид содержит X2 и X4;
- (vii) указанный первый полипептид содержит X1 и X4, и указанный второй полипептид содержит X2 и X3;
- (viii) указанный первый полипептид содержит X2 и X3, и указанный второй полипептид содержит X1 и X4;
- 10 (ix) указанный первый полипептид содержит X2 и X4, и указанный второй полипептид содержит X1 и X3;
- (x) указанный первый полипептид содержит X3 и X4, и указанный второй полипептид содержит X1 и X2;
- 15 (xi) указанный первый полипептид содержит X1, X2 и X3, и указанный второй полипептид содержит X4;
- (xii) указанный первый полипептид содержит X1, X2 и X4, и указанный второй полипептид содержит X3;
- (xiii) указанный первый полипептид содержит X1, X3 и X4, и указанный второй полипептид содержит X2; или
- 20 (xiv) указанный первый полипептид содержит X2, X3 и X4, и указанный второй полипептид содержит X1.
40. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-39, отличающийся тем,
- 25 что:
- a) указанный первый полипептид содержит X1 и не содержит X2, X3 и X4; и указанный второй полипептид представляет собой слитый белок, содержащий X3-Z1-X2-Z2-X4 и не содержащий X1;
- (b) указанный первый полипептид содержит X4 и не содержит X1, X2 и X3; и
- 30 указанный второй полипептид представляет собой слитый белок, содержащий X1-Z1-X3-Z2-X2 и не содержащий X4; или
- (c) указанный первый полипептид представляет собой слитый белок, содержащий X1-Z1-X3 и не содержащий X2 и X4; и указанный второй полипептид представляет собой слитый белок, содержащий X2-Z1-X4 и не содержащий X1 и X3;

при этом каждый из Z1 и Z2 независимо представляет собой необязательный аминокислотный линкер.

41. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-40, отличающийся тем, что X1, X2, X3 и X4, соответственно, содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична, соответственно, полной длине доменов X1, X2, X3 и X4, показанных ниже, при этом остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать:

10 X1: PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4)  
 X2: (K)DEAEKAKRMKEWMKRIKT (SEQ ID NO:7)  
 X3: (LE)DYAFNFELILEE~~I~~ARLF(ESG) (SEQ ID NO:5)  
 X4: (E)DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:6)

15 42. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-41, отличающийся тем, что указанный первый полипептид и указанный второй полипептид содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична паре первого и второго полипептидов, показанных ниже (подчеркнутые остатки или  
 20 остатки «X» являются необязательными, и каждый остаток необязательного домена, когда он присутствует, может содержать любую аминокислоту):

(i)

Первый полипептид X1 (Neo2A) PKKKIQLHAEHALYDALMILNIVKTNS (SEQ ID NO:256) и

25 Второй полипептид: X3-X2'-X4 (Neo2B)

TNSPPAEEKLEDYAFNFELILEE~~I~~ARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:257)

(ii)

30 Первый полипептид X1-X3-X2'

PKKKIQLHAEHALYDALMILNIVKTNSPPAEEKLEDYAFNFELILEE~~I~~ARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTAS (SEQ ID NO:258) и

Второй полипептид X4 TASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:259);

35 (iii)

Первый полипептид X1-X3

PKKKIQQLHAENALYDALMILNIVKTNSPPAEKLEDYAFNFELILEEIARLFESGD (SEQ ID NO:260) и

5 Второй полипептид X2-X4 DQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:261)

(iv)

Первый полипептид X1 (Neo4A) PKKKIQIMAEALKDALSILNIVKTNS (SEQ ID NO:262)

10

Второй полипептид X3-X2'-X4 (Neo4B)

TNSPPAEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMIEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:263)

15 (v)

Первый полипептид X1 PKKKIQQLHAENALYDALMILNXXXXXX (SEQ ID NO:311) и

Второй полипептид: X3-X2'-X4

XXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIARLFESGXXKDEAEKAKRMKEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:264)

20

(vi)

Первый полипептид X1-X3-X2'

PKKKIQQLHAENALYDALMILNXXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIARLFESGXXKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTAS (SEQ ID NO:265) и

25 Второй полипептид X4 XXXXXDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:266);

(vii)

Первый полипептид X1-X3

PKKKIQQLHAENALYDALMILNXXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIARLFESXXGD (SEQ ID NO:267) и

30

Второй полипептид X2-X4 DQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:268)

(viii)

35 Первый полипептид X1 PKKKIQIMAEALKDALSILNXXXXXX (SEQ ID NO:269)

Второй полипептид X3-X2'-X4

XXXXXXXXXQLERFAKRFERNLWGIARLFESGXXKDEAEKAKRMIEWMKRIKTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:270)

(ix)

Первый полипептид &gt;Neo4\_X1-X3'

5 PKKKIQIMAEELKDALSINIVKTNSPPAEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGD (SEQ ID NO:312)

Второй полипептид &gt;Neo4\_X2-X4

DQKDEAEKAKRMIEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:313)

(x)

Первый полипептид &gt; Neo4\_X1-X3'

10 PKKKIQIMAEELKDALSILNIXXXXXXXXXXXXXQLERFAKRFERNLWGIARLFESXX (SEQ ID NO:314)

Второй полипептид &gt;Neo4\_X2-X4

XXKDEAEKAKRMIEWMKRIKXXXXEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:315)

(xi)

15 Первый полипептид Neo4\_X1-X3'-X2

PKKKIQIMAEELKDALSINIVKTNSPPAEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMIEWMKRIKTTA (SEQ ID NO:316)

Второй полипептид Neo4X4

TTASEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:317)

20 (xii)

Первый полипептид Neo4\_X1-X3'-X2

PKKKIQIMAEELKDALSILNIXXXXXXXXXXXXXLERFAKRFERNLWGIARLFESXXXXKDEAEKAKRMIEWMKRIKXXX (SEQ ID NO:318)

Второй полипептид Neo4\_X4

25 XXXXXDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:319); или

(xiii)

Первый полипептид (X1)

PKKKIQQLHAENHALYDALMILNIVGGSS (SEQ ID NO:323), или  
SKEAIQQLHAENHALYDALMILNIVKTNS (SEQ ID NO:324), или  
PIQLHAENHALYDALMILNIV (SEQ ID NO:325)

Второй полипептид (X3-X2'-X4)

5 PKLEDYAFNFELEELIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS  
 (SEQ ID NO:326); или

GGSSGGLEDYAFNFELEELIARLFESGGSSGGKDEAEKAKRMKEWMKRITGGSSGGDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:327); или

10 GGSSGGLEDYAFNFELEELIARLFESGGSSGGGGEAEKAKRMKEWMKRIGGSSGGDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:328).

43. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-41, отличающийся тем, что X1, X2, X3 и X4, соответственно, содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%,  
 15 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична, соответственно, доменам X1, X2, X3, и X4 (определенным в Таблице 1), присутствующим в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11-94, 190-216, 247 и SEQ ID NO:275-300.

44. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-43, отличающийся тем,  
 20 что указанный первый полипептидный компонент и/или указанный второй полипептидный компонент содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь.

45. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-44, отличающийся тем, что указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный  
 25 компонент нековалентно ассоциированы.

46. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-44, отличающийся тем, что указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный компонент опосредовано связаны друг с другом рецептором.  
 30

47. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-46, отличающийся тем, что указанный первый полипептидный компонент дополнительно содержит первый

нацеливающий домен или указанный второй полипептидный компонент дополнительно содержит второй нацеливающий домен.

5 48. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-46, отличающийся тем, что указанный первый полипептидный компонент дополнительно содержит первый нацеливающий домен и указанный второй полипептидный компонент дополнительно содержит второй нацеливающий домен.

10 49. Условно активный агонист рецептора по п. 47 или 48, отличающийся тем, что указанный первый нацеливающий домен, когда он присутствует, представляет собой трансляционное слияние с указанным первым полипептидом, и при этом указанный второй нацеливающий домен, когда он присутствует, представляет собой трансляционное слияние с указанным вторым полипептидом.

15 50. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 47-49, отличающийся тем, что присутствует как указанный первый нацеливающий домен, так и указанный второй нацеливающий домен, и при этом указанный первый нацеливающий домен и указанный второй нацеливающий домен являются одинаковыми.

20 51. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 47-49, отличающийся тем, что присутствует как указанный первый нацеливающий домен, так и указанный второй нацеливающий домен, и при этом указанный первый нацеливающий домен и указанный второй нацеливающий домен отличаются.

25 52. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 47-51, отличающийся тем, что каждый из указанного первого нацеливающего домена и/или указанного второго нацеливающего домена связывается с белками клеточной поверхности.

30 53. Условно активный агонист рецептора по п. 52, отличающийся тем, что указанные белки клеточной поверхности присутствуют на поверхности клеток, выбранных из группы, состоящей из опухолевых клеток, сосудистых компонентов, микроокружения опухоли (например, фибробластов, инфильтрирующих иммунных клеток или стромальных элементов), других раковых клеток и иммунных клеток (включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные  
35 клетки, НК-клетки или макрофаги), причем такие поверхностные маркеры иммунной

клетки, включают, без ограничения перечисленными, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD40, CD68, CD123, CD254, PD-1, B7-H3 и CTLA-4.

54. Условно активный агонист рецептора по п. 52 или 53, отличающийся тем, что  
 5 каждый из указанного первого нацеливающего домена и указанного второго нацеливающего домена связывается с поверхностным маркером опухолевой клетки, клетки сосудистого компонента опухоли или клетки микроокружения опухоли.
- 55 Условно активный агонист рецептора по п. 54, отличающийся тем, что указанный  
 10 поверхностный маркер опухолевой клетки, клетки сосудистого компонента или клетки микроокружения опухоли выбран из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными: EGFR, EGFRvIII, Her2, HER3, EpCAM, MSLN, MUC16, PSMA, TROP2, ROR1, RON, PD-L1, CD47, CTLA-4, CD5, CD19, CD20, CD25, CD37, CD30, CD33, CD40, CD45, CAMPATH-1, BCMA, CS-1, PD-L1, B7-H3, B7-DC, HLD-DR,  
 15 карциноэмбриональный антиген (CEA), TAG-72, EpCAM, MUC1, связывающий фолат белок, A33, G250, простатоспецифический мембранный антиген (PSMA), ферритин, GD2, GD3, GM2, Le<sup>y</sup>, CA-125, CA19-9, эпидермальный фактор роста, p185HER2, рецептор IL-2, EGFRvIII (de2-7 EGFR), белок активации фибробластов, тенасцин, металлопротеиназу, эндосиалин, фактор роста эндотелия сосудов, avB3, WT1, LMP2, HPV E6, HPV E7, Her-  
 20 2/неу, MAGE A3, немутированный p53, NY-ESO-1, MelanA/MART1, немутированный Ras, gp100, немутированный p53, PR1, bcr-abl, тирониназу, сурвивин, PSA, hTERT, саркомный белок точки разрыва при транслокации, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, ERG, NA17, PAX3, ALK, рецептор андрогенов, циклин B 1, полисиаловую кислоту, MYCN, RhoC, TRP-2, фукозил-GM1, мезотелин (MSLN), PSCA, MAGE A1, sLe (животных), CYP1B1, PLAV1,  
 25 GM3, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, карбоангидразу IX, PAX5, OY-TESL белок спермы 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, легумин, Tie 3, VEGFR2, MAD-CT-1, PDGFR-B, MAD-CT-2, ROR2, TRAIL1, MUC16, MAGE A4, MAGE C2, GAGE, EGFR, CMET, HER3, MUC15, CA6, NAPI2B, TROP2, CLDN6, CLDN16, CLDN18.2, CLorf186, RON, LY6E, FRA, DLL3, PTK7, STRA6, TMPRSS3, TMPRSS4,  
 30 TMEM238, UPK1B, VTCN1, LIV1, ROR1, Fos-родственный антиген 1, BMPR1B (рецептор костного морфогенетического белка типа IB, номер доступа в Genbank NM. 001203); E16 (LAT1, SLC7A5, номер доступа в Genbank NM-003486); STEAP1 (шесть-трансмембранный эпителиальный антиген простаты, номер доступа в Genbank NM 012449); 0772P (CA125, MUC16, номер доступа в Genbank AF361486); MPF (MPF, MSLN, SMR, фактор потенцирования мегакариоцитов, мезотелин, номер доступа в Genbank NM

005823); Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, семейство носителей растворенных веществ 34 (фосфат натрия), член 2, натрийзависимый переносчик фосфата 3b типа II, номер доступа в Genbank NM 006424); Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm. 42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Hlog, сема-домен, семь тромбоспондиновых повторов (типа 1 и подобный типу 1), трансмембранный домен (TM) и короткий цитоплазматический домен (семафорин) 5B, номер доступа в Genbank AB040878); PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, кДНК RIKEN 2700050C12, кДНК гена RIKEN 2700050C12, номер доступа в Genbank AY358628); ETBR (рецептор эндотелина типа B, номер доступа в Genbank AY275463); MSG783 (RNF124, гипотетический белок FLJ20315, номер доступа в Genbank NM 017763); STEAP2 (HGNC.sub.--8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, ассоциированный с раком простаты ген 1, ассоциированный с раком простаты белок 1, шесть-трансмембранный эпителиальный антиген простаты 2, шесть-трансмембранный белок простаты, номер доступа в Genbank AF455138); TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, катионный канал транзиторного рецепторного потенциала, подсемейство M, член 4, номер доступа в Genbank NM 017636); CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, фактор роста, происходящий из тератокарциномы, номер доступа в Genbank NP003203 или NM003212); CD21 (CR2 (рецептор комплемента 2) или C3DR (рецептор вируса C3d/Эпштейна-Барр) или Hs. 73792, номер доступа в Genbank M26004); CD79b (IGb (иммуноглобулин-ассоциированный бета), B29, номер доступа в Genbank NM 000626); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (содержащий домен SH2 якорный белок фосфатазы 1a), SPAP1B, SPAP1C, номер доступа в Genbank NM030764); HER2 (номер доступа в Genbank M11730); NCA (номер доступа в Genbank M18728); MDP (номер доступа в Genbank BC017023); IL20R.alpha. (номер доступа в Genbank AF184971); бревикан (номер доступа в Genbank AF229053); Ephb2R (номер доступа в Genbank NM004442); ASLG659 (номер доступа в Genbank AX092328); PSCA (номер доступа в Genbank AJ297436); GEDA (номер доступа в Genbank AY260763); BAFF-R (номер доступа в Genbank NP443177.1); CD22 (номер доступа в Genbank NP-001762.1); CD79a (CD79A, CD79.альфа, иммуноглобулин-ассоциированный альфа, специфичный для В-клеток белок, который ковалентно взаимодействует с Ig бета (CD79B) и образует комплекс на поверхности с молекулами Ig M, трансдуцирует сигнал, участвующий в дифференцировке В-клеток, номер доступа в Genbank NP001774.1); CXCR5 (рецептор 1 лимфомы Беркитта, рецептор, сопряженный с G-белком, который активируется хемокином CXCL13, участвует в миграции лимфоцитов и гуморальной защите, участвует в инфекции ВИЧ-2 и, возможно, в развитии СПИДа, лимфомы, миеломы и лейкоза, номер доступа в Genbank NP001707.1); HLA-DOB (бета-субъединица молекулы ГКГС класса II (антиген Ia), которая

связывает пептиды и презентует их CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, номер доступа в Genbank NP002111.1); P2X5 (управляемый лигандом ионный канал 5 пуринергического рецептора P2X, ионный канал, управляемый внеклеточным АТФ, может участвовать в синаптической передаче и нейрогенезе, дефицит может вносить вклад в патофизиологию идиопатической нестабильности детрузора, номер доступа Genbank NP002552.2); CD72 (антиген дифференцировки В-клеток CD72, Lyb-2, номер доступа в Genbank NP001773.1); LY64 (антиген лимфоцитов 64 (RP105), мембранный белок типа I семейства богатых лейцином повторов (LRR), регулирует активацию В-клеток и апоптоз, потеря функции ассоциирована с повышенной активностью заболевания у пациентов с системной красной волчанкой, номер доступа в Genbank NP005573.1); FCRH1 (Fc-рецептор-подобный белок 1, предполагаемый рецептор для домена Fc иммуноглобулина, который содержит Ig-подобные домены типа C2 и домены ITAM, может участвовать в дифференцировке В-лимфоцитов, номер доступа в Genbank NP443170.1); или IRTA2 (ассоциированный с транслокацией рецептор суперсемейства иммуноглобулинов 2, предполагаемый иммунорецептор с возможными ролями в развитии В-клеток и лимфомагенезе; нарушение регуляции гена путем транслокации происходит при некоторых В-клеточных злокачественных опухолях, номер доступа в Genbank NP112571.1).

56. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 47-55, отличающийся тем, что указанный первый нацеливающий домен и/или указанный второй нацеливающий домен связываются с поверхностным маркером иммунной клетки (включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки, НК-клетки или макрофаги), причем указанный поверхностный маркер иммунной клетки может включать, но не ограничивается перечисленными: CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD40, CD68, CD123, CD254, PD-1, B7-H3 и CTLA-4, и/или при этом указанный нацеливающий домен связывается с PD-1, PDL-1, CTLA-4, TROP2, B7-H3, CD33, CD22, карбоангидразой IX, CD123, нектином-4, антигеном тканевого фактора, CD154, B7-H3, B7-H4, FAP (белок активации фибробластов) или MUC16.

57. Условно активный агонист рецептора по п. 52 или 53, отличающийся тем, что каждый из указанного первого нацеливающего домена и указанного второго нацеливающего домена связывается с поверхностными маркерами Т-клеток (включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки или макрофаги).

58. Условно активный агонист рецептора по п. 52 или 53, отличающийся тем, что как указанный первый нацеливающий домен, так и указанный второй нацеливающий домен связывается с поверхностным маркером опухолевой клетки, клетки сосудистого компонента или клетки микроокружения опухоли (например, фибробластов, инфильтрирующих иммунных клеток или стромальных элементов), и при этом указанный другой нацеливающий домен связывается с поверхностным маркером иммунной клетки (включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки или макрофаги), при этом указанный поверхностный маркер иммунной клетки может включать, но не ограничивается перечисленными: CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD40, CD68, CD123, CD254, PD-1, B7-H3 и CTLA-4.

59. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 47-58, отличающийся тем, что указанный первый нацеливающий домен и/или указанный второй нацеливающий домен могут включать, без ограничения перечисленными, scFv, F(ab), F(ab')<sub>2</sub>, рецептор В-клеток (BCR), DARPin, аффитело, монотело, нанотело, диатело, антитело (включая моноспецифичное или биспецифичное антитело); олигопептид, нацеленный на клетку, включая, но не ограничиваясь перечисленными: пептиды, связывающие интегрин RGD, сконструированные de novo связывающие агенты, аптамеры, бициклический пептид, конотоксины, малые молекулы, такие как фолиевая кислота, и вирус, который связывается с поверхностью клетки.

60. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 47-58, отличающийся тем, что указанный первый нацеливающий домен и/или указанный второй нацеливающий домен могут включать, без ограничения перечисленными, scFv, F(ab), F(ab')<sub>2</sub>, рецептор В-клеток (BCR), DARPin, аффитело, монотело, нанотело, диатело и антитело (включая моноспецифичное или биспецифичное антитело).

61. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-60, отличающийся тем, что X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична по своей длине KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7), при этом остатки в скобках являются необязательными.

62. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-60, отличающийся тем, что X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична по своей длине  
KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7), при этом остатки в скобках являются  
5   необязательными.
63. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-60, отличающийся тем, что X2 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична по своей длине  
10   KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7), при этом остатки в скобках являются  
необязательными.
64. Полипептид, содержащий 1, 2 или 3, но не все 4 домена X1, X2, X3 и X4, причем:
- а) X1, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий  
15   аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%,  
40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична  
полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI); (SEQ ID NO:4);
- (b) X2, когда он присутствует, представляет собой любой спиральный  
пептидный домен;
- 20   (c) X3, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий  
аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%,  
40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична  
полной длине пептида (LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5); и
- (d) X4, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий  
25   аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%,  
40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична  
полной длине пептида (EDEQEEMANAI)ITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6);  
аминокислотные остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать.
- 30   65. Полипептид по п. 64, отличающийся тем, что:
- а) X1, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий  
аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична полной  
длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI); (SEQ ID NO:4) или  
(PKKKI)QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4);

(b) X2, когда он присутствует, представляет собой любой спиральный пептидный домен;

(c) X3, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична полной длине пептида (LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES(G) (SEQ ID NO:5); и

(d) X4, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична полной длине пептида (E)DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или (E)DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:6).

66. Полипептид по п. 64, отличающийся тем, что:

a) X1, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI); (SEQ ID NO:4) или (PKKKI)QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4);

(b) X2, когда он присутствует, представляет собой любой спиральный пептидный домен;

(c) X3, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична полной длине пептида (LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG) (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES(G) (SEQ ID NO:5); и

(d) X4, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична полной длине пептида (E)DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или (E)DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:6).

67. Полипептид по п. 64, отличающийся тем, что:

a) X1, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида (PKKKIQ)LHAEHALYDAL(MILNI); (SEQ ID NO:4) или (PKKKI)QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4);

(b) X2, когда он присутствует, представляет собой любой спиральный пептидный домен;

- (c) X3, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида **(LE)DYAFNFELILEE(IARLFESG)** (SEQ ID NO:5) или **LEDYAFNFELILEE(IARLFES(G)** (SEQ ID NO:5); и
- 5 (d) X4, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную полной длине пептида **(EDEQEEMANA(I)ITILQSWIF(S)** (SEQ ID NO:6) или **(E)DEQEEMANA(I)ITILQSWIFS** (SEQ ID NO:6).
- 10 68. Полипептид по п. 64, отличающийся тем, что
- a) X1, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида **PKKKIQLHAEHALYDALMILNI** (SEQ ID NO:4);
- 15 (c) X3, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида **LEDYAFNFELILEE(IARLFESG)** (SEQ ID NO:5); и
- (d) X4, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий
- 20 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине пептида **EDEQEEMANA(I)ITILQSWIF(S)** (SEQ ID NO:6).
69. Полипептид по п. 64, отличающийся тем, что
- 25 a) X1, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65% идентична полной длине пептида **PKKKIQLHAEHALYDALMILNI** (SEQ ID NO:4) или **QLHAEHALYDALMILNI** (SEQ ID NO:320);
- (c) X3, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий
- 30 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65% идентична полной длине пептида **LEDYAFNFELILEE(IARLFESG)** (SEQ ID NO:5) или **LEDYAFNFELILEE(IARLFES)** (SEQ ID NO:321); и
- (d) X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65% идентична полной длине пептида

EDEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:322).

70. Полипептид по п. 68, отличающийся тем, что

5 а) X1, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична полной длине пептида PKKKIQLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:320);

10 (с) X3, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична полной длине пептида LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321); и

15 (d) X4, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична полной длине пептида EDEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:322).

71. Полипептид по п. 68, отличающийся тем, что

20 а) X1, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична полной длине пептида PKKKIQLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или QLHAЕНАLYDALMILNI (SEQ ID NO:320);

25 (с) X3, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична полной длине пептида LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321); и

30 (d) X4, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична полной длине пептида EDEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или DEQEEMANAИТИЛQSWIF(S) (SEQ ID NO:322).

72. Полипептид по п. 68, отличающийся тем, что

а) X1, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична полной

длине пептида PKKKIQLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:4) или  
QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320);

(с) X3, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий  
аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична полной

5 длине пептида LEDYAFNFELILEEIARLFESG (SEQ ID NO:5) или  
LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321); и

(d) X4, когда он присутствует, представляет собой пептид, содержащий  
аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична полной  
длине пептида EDEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:6) или

10 DEQEEMANAITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:322).

73. Полипептид по любому из пп. 64-72, отличающийся тем, что X2, когда он  
присутствует, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере  
на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%,  
98% или 100% идентична полной длине пептида KDEAEKAKRMKEWMKRIKT (SEQ ID  
15 NO:7), при этом остатки в скобках являются необязательными.

74. Полипептид по любому из пп. 64-72, отличающийся тем, что X2, когда он  
присутствует, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере  
на 75% идентична полной длине пептида KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7),  
20 при этом остатки в скобках являются необязательными.

75. Полипептид по любому из пп. 64-72, отличающийся тем, что X2, когда он  
присутствует, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере  
на 85% идентична полной длине пептида KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7),  
25 при этом остатки в скобках являются необязательными.

76. Полипептид по любому из пп. 64-72, отличающийся тем, что X2, когда он  
присутствует, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере  
на 90% идентична полной длине пептида KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7),  
30 при этом остатки в скобках являются необязательными.

77. Полипептид по любому из пп. 64-72, отличающийся тем, что X2, когда он  
присутствует, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере  
на 80% идентична полной длине пептида KDEAEKAKRMKEWMKRIKT (SEQ ID NO:7),  
35 при этом остатки в скобках являются необязательными.

78. Полипептид по любому из пп. 64-72, отличающийся тем, что X2, когда он присутствует, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична полной длине пептида KDEAEKAKRMKEWMKRIKT (SEQ ID NO:7),  
5 при этом остатки в скобках являются необязательными.
79. Полипептид по любому из пп. 64-78, выбранный из группы, состоящей из:
- (i) полипептида, содержащего X1 и не содержащего X2, X3 и X4;
  - (ii) полипептида, содержащего X2 и не содержащего X1, X3 и X4;
  - 10 (iii) полипептида, содержащего X3 и не содержащего X1, X2 и X4;
  - (iv) полипептида, содержащего X4 и не содержащего X1, X2 и X3;
  - (v) полипептида, содержащего X1 и X2 и не содержащего X3 и X4;
  - (vi) полипептида, содержащего X1 и X3 и не содержащего X2 и X4;
  - (vii) полипептида, содержащего X1 и X4 и не содержащего X2 и X3;
  - 15 (viii) полипептида, содержащего X2 и X3 и не содержащего X1 и X4;
  - (ix) полипептида, содержащего X2 и X4 и не содержащего X1 и X3;
  - (x) полипептида, содержащего X3 и X4 и не содержащего X1 и X2;
  - (xi) полипептида, содержащего X1, X2 и X3 и не содержащего X4;
  - (xii) полипептида, содержащего X1, X2 и X4 и не содержащего X3;
  - 20 (xiii) полипептида, содержащего X1, X3 и X4 и не содержащего X2; и
  - (xiv) полипептида, содержащего X2, X3 и X4 и не содержащего X1.
80. Полипептид по любому из пп. 64-79, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит X1, причем X1 включает 1, 2, 3, 4 или все 5 из перечисленных  
25 далее: L в остатке 7, H в остатке 8, N в остатке 11, Y в остатке 14; M в остатке 18, при этом указанная нумерация относится к SEQ ID NO:4 на основании присутствия необязательных остатков.
81. Полипептид по любому из пп. 64-80, отличающийся тем, что указанный  
30 полипептид содержит X3, причем X3 включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все 8 из перечисленных далее: D в остатке 3, Y в остатке 4, F в остатке 6, N в остатке 7, L в остатке 10, I в остатке 11, E в остатке 13 или E в остатке 14, при этом указанная нумерация относится к SEQ ID NO:5 на основании присутствия необязательных остатков.

82. Полипептид по любому из пп. 64-81, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит X4, причем X4 включает I в остатке 19, при этом указанная нумерация относится к SEQ ID NO:6 на основании присутствия необязательных остатков.
- 5 83. Полипептид по любому из пп. 64-79, отличающийся тем, что X1 присутствует, причем X1 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична по своей длине пептиду PKKKIQIMAEELKDALNIL (SEQ ID NO:8), и при этом X1 включает I в  
10 остатке 7, T или M в остатке 8, E в остатке 11, K в остатке 14 и S в остатке 18.
84. Полипептид по любому из пп. 64-79 или 83, отличающийся тем, что X3 присутствует, причем X3 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 37%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%,  
15 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична по своей длине пептиду LERFAKRFERNLWGIARLFESG (SEQ ID NO:9), и при этом X3 включает R в остатке 3, F в остатке 4, K в остатке 6, R в остатке 7, R в остатке 10, N в остатке 11, W в остатке 13 и G в остатке 14.
- 20 85. Полипептид по любому из пп. 64-79, 84 или 84, отличающийся тем, что X4 присутствует, причем X4 представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична по своей длине пептиду  
25 EDEQEEMANAHTILQSWFFS (SEQ ID NO:10).
86. Полипептид по п. 85, отличающийся тем, что X4 включает F в остатке 19.
87. Полипептид по любому из пп. 64-86, отличающийся тем, что аминокислотные  
30 (АК) замены относительно референсных пептидных доменов присутствуют не более чем в 3 остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 2 остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом, или присутствуют не более чем в 1 остатке аминокислоты, выделенном жирным шрифтом, или не присутствуют в остатках аминокислот, выделенных жирным шрифтом.

88. Полипептид по любому из пп. 64-87, отличающийся тем, что аминокислотные замены относительно референсных пептидных доменов представляют собой консервативные аминокислотные замены.

5 89. Полипептид по любому из пп. 64-88, отличающийся тем, что X1 присутствует, и при этом аминокислотные остатки относительно SEQ ID NO:4 выбраны из группы, состоящей из:

	Положение 01:	A	F	I	L	M	P	Q	R	S	W
	Положение 02:	A	D	E	G	V	K				
10	Положение 03:	D	E	F	W	K					
	Положение 04:	D	E	K	N	P	R	W			
	Положение 05:	D	E	H	I	K	L	M	S		
	Положение 06:	A	D	E	G	L	P	S	W	Q	
	Положение 07:	D	E	L	Q	Y	I				
15	Положение 08:	A	F	H	W	Y	M	T			
	Положение 09:	C	F	P	A						
	Положение 10:	C	D	E	F	K	P				
	Положение 11:	D	F	H	E						
	Положение 12:	A	D	E	P	S	T	V			
20	Положение 13:	H	I	L	M	P	R	V	W		
	Положение 14:	F	R	W	Y	K					
	Положение 15:	D	E	N	Y						
	Положение 16:	A	C	L	M	S					
	Положение 17:	F	I	L	M	P	R				
25	Положение 18:	G	M	Q	Y	S					
	Положение 19:	I	L	M	P	Q	V				
	Положение 20:	A	K	L	M	Q	R	S			
	Положение 21:	G	K	N	P	R	S	W			
	Положение 22:	D	E	I	K	M	N	W	Y		

30

90. Полипептид по п. 89, отличающийся тем, что положение 7 представляет собой I, положение 8 представляет собой M или T, положение 11 представляет собой E, положение 14 представляет собой K и положение 18 представляет собой S.

91. Полипептид по п. 89, отличающийся тем, что 1, 2, 3, 4 или 5 из перечисленных далее утверждений не являются истинными: положение 7 представляет собой I, положение 8 представляет собой M или T, положение 11 представляет собой E, положение 14 представляет собой K и положение 18 представляет собой S.

5

92. Полипептид по любому из пп. 64-91, отличающийся тем, что X3 присутствует, и при этом аминокислотные остатки относительно SEQ ID NO:5 выбраны из группы, состоящей из:

	Положение 01:	A	L								
10	Положение 02:	D	E	G	K	M	T				
	Положение 03:	D	E	N	Y	R					
	Положение 04:	C	D	G	T	Y	F				
	Положение 05:	A	F	H	S	V	W	Y			
	Положение 06:	A	F	I	M	T	V	Y	K		
15	Положение 07:	D	K	N	S	T	R				
	Положение 08:	A	C	G	L	M	S	V	F		
	Положение 09:	C	H	K	L	R	S	T	V	E	
	Положение 10:	F	I	L	M	Y	R				
	Положение 11:	I	L	N	T	Y					
20	Положение 12:	F	K	L	M	S	V				
	Положение 13:	A	D	F	G	I	N	P	Q	STEW	
	Положение 14:	A	E	F	G	H	S	V			
	Положение 15:	C	I	L	M	V	W				
	Положение 16:	A	D	G	S	T	V				
25	Положение 17:	H	K	L	N	R					
	Положение 18:	C	D	G	I	L	Q	R	T	W	
	Положение 19:	D	F	M	N	W					
	Положение 20:	A	C	E	F	G	M	S	Y		
	Положение 21:	D	E	G	H	L	M	R	S	T	V
30	W										
	Положение 22:	A	D	G	K	N	S	Y			

93. Полипептид по п. 92, содержащий замену цистеина в положении 17 или 20 относительно SEQ ID NO:5.

35

94. Полипептид по п. 92 или 93, отличающийся тем, что положение 3 представляет собой R, положение 4 представляет собой F, положение 6 представляет собой K, положение 7 представляет собой R, положение 10 представляет собой R, положение 11 представляет собой N, положение 13 представляет собой W и положение 14 представляет собой G.
95. Полипептид по п. 92 или 93, отличающийся тем, что 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все 8 из перечисленных далее утверждений не являются истинными: положение 3 представляет собой R, положение 4 представляет собой F, положение 6 представляет собой K, положение 7 представляет собой R, положение 10 представляет собой R, положение 11 представляет собой N, положение 13 представляет собой W и положение 14 представляет собой G.
96. Полипептид по любому из пп. 64-95, отличающийся тем, что X4 присутствует, и при этом аминокислотные остатки относительно SEQ ID NO:6 выбраны из группы, состоящей из:
- |               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Положение 01: | D | E | G | K | V |   |   |   |   |   |
| Положение 02: | D | I | M | S |   |   |   |   |   |   |
| Положение 03: | E | G | H | K |   |   |   |   |   |   |
| Положение 04: | E | G | I | K | Q | R | S |   |   |   |
| Положение 05: | A | D | E | G | H | S | V |   |   |   |
| Положение 06: | C | D | E | G | I | M | Q | R | T | V |
| Положение 07: | C | E | L | M | P | R | T |   |   |   |
| Положение 08: | A | F | L | M | W |   |   |   |   |   |
| Положение 09: | A | G | L | N | Q | R | T |   |   |   |
| Положение 10: | A | C | D | E | F | H | I | W |   |   |
| Положение 11: | I | M | N | S | V | W |   |   |   |   |
| Положение 12: | I | K | L | S | V |   |   |   |   |   |
| Положение 13: | C | L | M | R | S | T |   |   |   |   |
| Положение 14: | I | L | P | T | Y |   |   |   |   |   |
| Положение 15: | F | G | I | L | M | N | V |   |   |   |
| Положение 16: | H | K | Q | R |   |   |   |   |   |   |
| Положение 17: | C | F | K | S | W | Y |   |   |   |   |
| Положение 18: | K | Q | T | W |   |   |   |   |   |   |
| Положение 19: | C | G | N | I |   |   |   |   |   |   |

Положение 20: C F G L Y  
 Положение 21: A F G H S Y

5 97. Полипептид по п. 96, содержащий замену цистеина в положении 3 относительно SEQ NO: 6.

98. Полипептид по п. 95 или 96, отличающийся тем, что положение 19 представляет собой I.

10 99. Полипептид по п. 95 или 96, отличающийся тем, что положение 19 не является I.

100. Полипептид по любому из пп. 64-99, отличающийся тем, что X4 присутствует, и при этом аминокислотные остатки относительно SEQ ID NO:7 выбраны из группы, состоящей из:

15	Положение 01:	A	H	L	M	R	S	V	K		
	Положение 02:	A	D	E	Q	R	S	T	V	W	Y
	Положение 03:	C	E	G	K	L	N	Q	R	W	
	Положение 04:	A	F	G	N	S	T	V	Y		
	Положение 05:	A	E	G	I	M	R	V			
20	Положение 06:	C	E	K	L	N	R	V			
	Положение 07:	A	C	E	I	L	S	T	V	W	
	Положение 08:	H	K	L	M	S	T	W	Y		
	Положение 09:	A	I	L	M	Q	S	R			
	Положение 10:	A	I	M	S	W	Y				
25	Положение 11:	C	I	K	L	S	V				
	Положение 12:	C	E	K	L	P	Q	R	T		
	Положение 13:	A	D	H	N	W					
	Положение 14:	A	C	G	I	L	S	T	V	M	
	Положение 15:	A	E	G	I	K	L	M	R	V	
30	Положение 16:	G	H	L	R	S	T	V			
	Положение 17:	A	I	L	V						
	Положение 18:	A	C	D	E	G	H	I	K	M	S
	Положение 19:	D	E	G	L	N	V	T			

101. Полипептид по п. 100, содержащий замену цистеина в положении 1, 2, 5, 9, 12 или 16 относительно SEQ NO: 7.

5 102. Полипептид по п. 101 или 101, отличающийся тем, что положение 11 представляет собой I.

103. Полипептид по п. 100 или 101, отличающийся тем, что положение 11 не является I.

10 104. Полипептид по любому из пп. 64-103, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична первому или второму полипептиду, перечисленным ниже (подчеркнутые остатки являются необязательными, и каждый необязательный остаток, когда он присутствует, может содержать любую аминокислоту):

15 (i)

Первый полипептид X1 (Neo2A) PKKKIQLHAENALYDALMILNIVKTNS (SEQ ID NO:256) и

Второй полипептид: X3-X2'-X4 (Neo2B)

20 TNSPPAEKLEDYAFNFELILEEIIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITIL QSWIFS (SEQ ID NO:257)

(ii)

Первый полипептид X1-X3-X2'

25 PKKKIQLHAENALYDALMILNIVKTNSPPAEKLEDYAFNFELILEEIIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEW MKRIKTAS (SEQ ID NO:258) и

Второй полипептид X4 TTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:259);

(iii)

Первый полипептид X1-X3

30 PKKKIQLHAENALYDALMILNIVKTNSPPAEKLEDYAFNFELILEEIIARLFESGD (SEQ ID NO:260) и

Второй полипептид X2-X4 DQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:261)

35 (iv)

Первый полипептид X1 (Neo4A) PKKKIQIMAEELKDALSILNIVKTNS (SEQ ID NO:262)

Второй полипептид X3-X2'-X4 (Neo4B)

TNSPPAEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMI EWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITIL  
QSWFFS (SEQ ID NO:263)

5

(v)

Первый полипептид X1 (Neo2A) PKKKIQLHAENALYDALMILNIXXXXXX (SEQ ID  
NO:311) и

Второй полипептид: X3-X2'-X4 (Neo2B)

10 XXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIIARLFESGXKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTXXXEDEQEEMANAIITIL  
QSWIFS (SEQ ID NO:264)

(vi)

Первый полипептид X1-X3-X2'

15 PKKKIQLHAENALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIIARLFESGXKDEAEKAKRMKEW  
MKRIKTTAS (SEQ ID NO:265) и

Второй полипептид X4 XXXXXDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:266);

(vii)

20 Первый полипептид X1-X3

PKKKIQLHAENALYDALMILNIXXXXXXXXXXXXXLEDYAFNFELILEEIIARLFESXXXGD (SEQ ID  
NO:267) и

Второй полипептид X2-X4 DQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTXXXEDEQEEMANAIITILQSWIFS  
(SEQ ID NO:268)

25

(viii)

Первый полипептид X1 (Neo4A) PKKKIQIMAEALKDALSILNIXXXXXX (SEQ ID  
NO:269)

30 Второй полипептид X3-X2'-X4 (Neo4B)

XXXXXXXXXQLERFAKRFERNLWGIARLFESGXKDEAEKAKRMI EWMKRIKTTXXXEDEQEEMANAIITIL  
QSWFFS (SEQ ID NO:270)

(ix)

35 Первый полипептид >Neo4\_X1-X3'

PKKKIQIMAEALKDALSILNIVKTNSPPAEEQLERFAKRFERNLWGIARLFESGD (SEQ ID  
NO:312)

Второй полипептид >Neo4\_X2-X4

DQKDEAEKAKRMIEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:313)

(x)

Первый полипептид >Neo4\_X1-X3'

- 5 PKKKIQIMAEELKDALSIINXXXXXXXXXXXXQLERFAKRFFERNLWGIARLFESXX (SEQ ID NO:314)

Второй полипептид >Neo4\_X2-X4

XXKDEAEKAKRMIEWMKRIKXXXXEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:315)

(xi)

- 10 Первый полипептид Neo4\_X1-X3'-X2

PKKKIQIMAEELKDALSIINIVKTNSPPAEEQLERFAKRFFERNLWGIARLFESGDQKDEAEKAKRMIEW MKRIKTTA (SEQ ID NO:316)

Второй полипептид Neo4\_X4

TTASEDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:317)

- 15 (xii)

Первый полипептид Neo4\_X1-X3'-X2

PKKKIQIMAEELKDALSIINXXXXXXXXXXXXLERFAKRFFERNLWGIARLFESXXXXKDEAEKAKRMIEW MKRIKXXX (SEQ ID NO:318)

Второй полипептид Neo4\_X4

- 20 XXXXXDEQEEMANAIITILQSWFFS (SEQ ID NO:319);

(xiii)

Первый полипептид (X1)

PKKKIQLHAENALYDALMILNIVGGSS (SEQ ID NO:323), или

SKEAIQLHAENALYDALMILNIVKTNS (SEQ ID NO:324), или

- 25 PIQLHAENALYDALMILNIV (SEQ ID NO:325)

Второй полипептид (X3-X2'-X4)

PKLEDYAFNFELILEEIIARLFESGDQKDEAEKAKRMKEWMKRIKTTASEDEQEEMANAIITILQSWIFS  
(SEQ ID NO:326); или

GGSSGGLEDYAFNFELILEEIIARLFESGGSSGGKDEAEKAKRMKEWMKRITGGSSGGDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:327); или

5 GGSSGGLEDYAFNFELILEEIIARLFESGGSSGGGGEAEKAKRMKEWMKRIGGSSGGDEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:328).

105. Полипептид по любому из пп. 64-103, отличающийся тем, что X1, X2, X3 и X4, когда они присутствуют, содержат аминокислотную последовательность, которая по  
10 меньшей мере на 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична, соответственно, доменам X1, X2, X3 и X4 (определенным в Таблице 1), присутствующим в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11-94, 190-216, 247 и SEQ ID NO:275-300.

15 106. Полипептид по любому из пп. 64-105, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь.

107. Полипептид по любому из пп. 64-106, отличающийся тем, что указанный полипептид дополнительно содержит нацеливающий домен.

20 108. Полипептид по п. 107, отличающийся тем, что указанный нацеливающий домен представляет собой трансляционное слияние с указанным полипептидом.

25 109. Полипептид по п. 108, отличающийся тем, что указанный нацеливающий домен связывается с белком клеточной поверхности.

110. Полипептид по п. 109, отличающийся тем, что указанный белок клеточной поверхности присутствует на поверхности клеток, выбранных из группы, состоящей из опухолевых клеток, сосудистых компонентов, микроокружения опухоли (например, фибробластов, инфильтрирующих иммунных клеток или стромальных элементов), других  
30 раковых клеток и иммунных клеток (включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки, НК-клетки или макрофаги), такие поверхностные маркеры иммунных клеток, включают, без ограничения

перечисленными, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD40, CD68, CD123, CD254, PD-1, B7-H3 и CTLA-4.

111. Полипептид по любому из пп. 107-110, отличающийся тем, что указанный  
 5 нацеливающий домен связывается с поверхностным маркером опухолевой клетки, клетки сосудистого компонента или клетки микроокружения опухоли (например, фибробластов, инфильтрирующих иммунных клеток или стромальных элементов).
112. Условно активный агонист рецептора по п. 111, отличающийся тем, что указанный  
 10 поверхностный маркер опухолевой клетки, клетки сосудистого компонента или клетки микроокружения опухоли выбран из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными: EGFR, EGFRvIII, Her2, HER3, EpCAM, MSLN, MUC16, PSMA, TROP2, ROR1, RON, PD-L1, CD47, CTLA-4, CD5, CD19, CD20, CD25, CD37, CD30, CD33, CD40, CD45, CAMPATH-1, BCMA, CS-1, PD-L1, B7-H3, B7-DC, HLD-DR,  
 15 карциноэмбриональный антиген (CEA), TAG-72, EpCAM, MUC1, связывающий фолат белок, A33, G250, простатоспецифический мембранный антиген (PSMA), ферритин, GD2, GD3, GM2, Le<sup>y</sup>, CA-125, CA19-9, эпидермальный фактор роста, p185HER2, рецептор IL-2, EGFRvIII (de2-7 EGFR), белок активации фибробластов, тенасцин, металлопротеиназу, эндосиалин, фактор роста эндотелия сосудов, avB3, WT1, LMP2, HPV E6, HPV E7, Her-  
 20 2/неу, MAGE A3, немутантный p53, NY-ESO-1, MelanA/MART1, немутантный Ras, gp100, немутантный p53, PR1, bcr-abl, тирониназу, сурвивин, PSA, hTERT, саркомный белок точки разрыва при транслокации, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, ERG, NA17, PAX3, ALK, рецептор андрогенов, циклин B 1, полисиаловую кислоту, MYCN, RhoC, TRP-2, фукозил-  
 25 GM1, мезотелин (MSLN), PSCA, MAGE A1, sLe(животных), CYP1B1, PLAV1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, карбоангидразу IX, PAX5, OY-TESL белок спермы 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, легумин, Tie 3, VEGFR2, MAD-CT-1, PDGFR-B, MAD-CT-2, ROR2, TRAIL1, MUC16, MAGE A4, MAGE C2, GAGE, EGFR, CMET, HER3, MUC15, CA6, NAPI2B, TROP2, CLDN6, CLDN16, CLDN18.2, CLorf186, RON, LY6E, FRA, DLL3, PTK7, STRA6, TMPRSS3, TMPRSS4,  
 30 TMEM238, UPK1B, VTCN1, LIV1, ROR1, Fos-родственный антиген 1, BMPR1B (рецептор костного морфогенетического белка типа IB, номер доступа в Genbank NM 001203); E16 (LAT1, SLC7A5, номер доступа в Genbank NM-003486); STEAP1 (шесть-  
 трансмембранный эпителиальный антиген простаты, номер доступа в Genbank NM 012449); 0772P (CA125, MUC16, номер доступа в Genbank AF361486); MPF (MPF, MSLN,  
 35 SMR, фактор потенцирования мегакариоцитов, мезотелин, номер доступа в Genbank NM

005823); Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, семейство носителей растворенного вещества 34 (фосфат натрия), член 2, натрийзависимый переносчик фосфата 3b типа II, номер доступа в Genbank NM 006424); Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm. 42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Hlog, сема-домен, семь тромбоспондиновых повторов

5 (типа 1 и подобных типу 1), трансмембранный домен (TM) и короткий цитоплазматический домен (семафорин) 5B, номер доступа в Genbank AB040878); PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, κДНК RIKEN 2700050C12, κДНК гена RIKEN 2700050C12, номер доступа Genbank AY358628); ETBR (рецептор эндотелина типа B, номер доступа в Genbank AY275463); MSG783 (RNF124, гипотетический белок FLJ20315, номер доступа в Genbank NM 017763); STEAP2 (HGNC.sub.--8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, ассоциированный с раком простаты ген 1, ассоциированный с раком простаты белок 1, шесть-трансмембранный эпителиальный антиген простаты 2, шесть-трансмембранный белок простаты, номер доступа Genbank AF455138); TrpM4

10 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, катионный канал транзиторного рецепторного потенциала, подсемейство M, член 4, номер доступа в Genbank NM 017636); CRYPTO (CR, CR1, CRGF, CRYPTO, TDGF1, фактор роста, происходящий из тератокарциномы, номер доступа в Genbank NP003203 или NM003212); CD21 (CR2 (рецептор комплемента 2) или C3DR (рецептор вируса C3d/Эпштейна-Барр) или Hs. 73792, номер доступа в Genbank M26004); CD79b (IGb (иммуноглобулин-ассоциированный бета), B29, номер доступа в

20 Genbank NM 000626); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (содержащий домен SH2 якорный белок фосфатазы 1a), SPAP1B, SPAP1C, номер доступа в Genbank NM030764); HER2 (номер доступа в Genbank M11730); NCA (номер доступа в Genbank M18728); MDP (номер доступа в Genbank BC017023); IL20R.alpha. (номер доступа в Genbank AF184971); бревикан (номер доступа в Genbank AF229053); Ephb2R (номер доступа в Genbank

25 NM004442); ASLG659 (номер доступа в Genbank AX092328); PSCA (номер доступа в Genbank AJ297436); GEDA (номер доступа в Genbank AY260763); BAFF-R (номер доступа в Genbank NP443177.1); CD22 (номер доступа в Genbank NP-001762.1); CD79a (CD79A, CD79.альфа, иммуноглобулин-ассоциированный альфа, специфичный для В-клеток белок, который ковалентно взаимодействует с Ig бета (CD79B) и образует комплекс на

30 поверхности с молекулами Ig M, трансдуцирует сигнал, участвующий в дифференцировке В-клеток, номер доступа в Genbank NP001774.1); CXCR5 (рецептор 1 лимфомы Беркитта, рецептор, сопряженный с G-белком, который активируется хемокином CXCL13, участвует в миграции лимфоцитов и гуморальной защите, играет роль в инфекции ВИЧ-2 и, возможно, в развитии СПИДа, лимфомы, миеломы и лейкоза, номер доступа в Genbank

35 NP001707.1); HLA-DOB (бета-субъединица молекулы ГКГС класса II (антиген Ia), которая

связывает пептиды и презентует их CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, номер доступа в Genbank NP002111.1); P2X5 (управляемый лигандом ионный канал 5 пуринергического рецептора P2X, ионный канал, управляемый внеклеточным АТФ, может участвовать в синаптической передаче и нейрогенезе, дефицит может вносить вклад в патофизиологию идиопатической нестабильности детрузора, номер доступа Genbank NP002552.2); CD72 (антиген дифференцировки В-клеток CD72, Lyb-2, номер доступа в Genbank NP001773.1); LY64 (антиген лимфоцитов 64 (RP105), мембранный белок типа I семейства богатых лейцином повторов (LRR), регулирует активацию В-клеток и апоптоз, потеря функции ассоциирована с повышенной активностью заболевания у пациентов с системной красной волчанкой, номер доступа в Genbank NP005573.1); FCRH1 (Fc-рецептор-подобный белок 1, предполагаемый рецептор для домена Fc иммуноглобулина, который содержит Ig-подобные домены типа C2 и домены ITAM, может участвовать в дифференцировке В-лимфоцитов, номер доступа в Genbank NP443170.1); или IRTA2 (ассоциированный с транслокацией рецептора суперсемейства иммуноглобулинов 2, предполагаемый иммунорецептор с возможными ролями в развитии В-клеток и лимфомагенезе; нарушение регуляции гена путем транслокации происходит при некоторых В-клеточных злокачественных новообразованиях, номер доступа в Genbank NP112571.1).

113. Полипептид по любому из пп. 107-100, отличающийся тем, что указанный нацеливающий домен связывается с поверхностным маркером иммунной клетки (включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки или макрофаги), причем указанный поверхностный маркер иммунной клетки может включать, но не ограничивается перечисленными: CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD40, CD68, CD123, CD254, PD-1, B7-H3 и CTLA-4.

114. Полипептид по любому из пп. 107-113, отличающийся тем, что указанный нацеливающий домен может включать, но не ограничивается перечисленными: scFv, F(ab), F(ab')<sub>2</sub>, В-клеточный рецептор (BCR), DARPin, аффитело, монотело, нанотело, диатело, антитело (включая моноспецифичное или биспецифичное антитело); олигопептид, нацеленный на клетку, включая, но не ограничиваясь перечисленными: пептиды, связывающие интегрин RGD, сконструированные de novo связывающие агенты, аптамеры, бициклический пептид, конотоксины, малые молекулы, такие как фолиевая кислота, и вирус, который связывается с поверхностью клетки.

115. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп. 64-114, или первый полипептидный компонент, или второй полипептидный компонент по любому из пп. 1-63.
- 5 116. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 115, функционально связанную с промотором.
117. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 115 и/или вектор экспрессии по п. 116.
- 10 118. Фармацевтическая композиция, содержащая условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-63, полипептид по любому из пп. 64-114, нуклеиновую кислоту по п. 115, вектор экспрессии по п. 116 или клетку-хозяин по п. 117, и фармацевтически приемлемый носитель.
- 15 119. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, условно активного агониста рецептора по любому из пп. 1-63 в условиях, в которых указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный компонент взаимодействуют на клетках опухоли для лечения рака.
- 20 120. Способ по п. 119, отличающийся тем, что указанный первый полипептидный компонент содержит первый нацеливающий домен и указанный второй полипептидный компонент содержит второй нацеливающий домен, причем указанный первый нацеливающий домен связывается с первым маркером опухолевой клетки и указанный
- 25 второй нацеливающий домен связывается со вторым маркером опухолевой клетки, который может быть таким же или отличаться от первого маркера опухолевой клетки, и при этом указанный первый полипептид и указанный второй полипептид взаимодействуют только после связывания указанного первого нацеливающего домена с
- 30 первым маркером опухолевой клетки и связывания указанного второго нацеливающего домена со вторым маркером опухолевой клетки.
121. Способ по п. 120, отличающийся тем, что указанный первый полипептидный компонент содержит первый нацеливающий домен и указанный второй полипептидный компонент содержит второй нацеливающий домен, причем указанный первый
- 35 нацеливающий домен связывается с маркером опухолевой клетки и указанный второй

нацеливающий домен связывается с маркером иммунной клетки (включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки или макрофаги), и при этом указанный первый полипептид и указанный второй полипептид взаимодействуют только после связывания указанного первого

5 нацеливающего домена с маркером опухолевой клетки и связывания указанного второго нацеливающего домена с маркером иммунной клетки.

122. Способ по п. 120, отличающийся тем, что указанный первый полипептидный компонент содержит первый нацеливающий домен и указанный второй полипептидный компонент содержит второй нацеливающий домен, причем указанный первый нацеливающий домен связывается с первым маркером иммунной клетки (включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки или макрофаги) и указанный второй нацеливающий домен связывается со вторым маркером иммунной клетки (включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD8<sup>+</sup> Т-клетки, Т-регуляторные клетки, дендритные клетки или макрофаги), который может быть таким же или отличаться от указанного первого маркера иммунной клетки, и при этом указанный первый полипептид и указанный второй полипептид взаимодействуют только после связывания указанного первого нацеливающего домена с первым маркером иммунной клетки и связывания указанного второго нацеливающего домена со вторым маркером иммунной клетки.

123. Способ по пп. 119-122, отличающийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака ободочной кишки, меланомы, рака почек, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака желудка, уротелиальной карциномы, лимфомы Ходжкина, немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, гепатоцеллюлярной карциномы, рака поджелудочной железы, карциномы из клеток Меркеля, колоректального рака, острого миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, рака яичников, рака шейки матки и любых типов опухолей, выбранных с помощью диагностического теста, такого как микросателлитная нестабильность, мутационная нагрузка опухоли, уровень экспрессии PD-L1 или анализ Immunoscore<sup>®</sup> (разработанный Обществом иммунотерапии рака).

124. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-63, полипептид по любому из пп. 64-114, нуклеиновая кислота по п. 115, вектор экспрессии по п. 116 или

клетка-хозяин по п. 117, или фармацевтическая композиция по п. 118 для применения в качестве лекарственного средства для лечения рака и/или для модуляции иммунного ответа у субъекта.

- 5 125. Способ модуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту условно активного агониста рецептора по любому из пп. 1-63, полипептида по любому из пп. 64-114, нуклеиновой кислоты по п. 115, вектора экспрессии по п. 116, или клетки-хозяина по п. 117, или фармацевтической композиции по п. 118.
- 10 126. Способ по п. 125, отличающийся тем, что указанный иммунный ответ представляет собой противораковый иммунный ответ, тканерегенеративный иммунный ответ или ранозаживляющий иммунный ответ.
127. Способ по п. 125 или 126, отличающийся тем, что указанный условно активный  
15 агонист рецептора, нуклеиновую кислоту, вектор экспрессии, клетку-хозяина или фармацевтическую композицию вводят как компонент биоматериала.
128. Способ агонистического действия на рецептор IL-2 или рецептор IL-4, включающий введение субъекту условно активного агониста рецептора по любому из пп.  
20 1-63 в условиях, в которых указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептидный компонент взаимодействуют на указанном рецепторе.
129. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-63, отличающийся тем, что указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептид  
25 взаимодействуют с образованием активного агониста гетеродимера  $\beta_c$  рецептора IL-2a (IL-2R $\beta_c$ ).
130. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-63, отличающийся тем, что указанный первый полипептидный компонент и указанный второй полипептид  
30 взаимодействуют с образованием активного агониста гетеродимера  $\alpha_c$  рецептора IL-4 (IL-4R $\alpha_c$ ), IL-13 альфа или гетеродимера IL-4Rальфа/IL13Rальфа.
131. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-63, отличающийся тем, что указанные в скобках аминокислотные остатки присутствуют.

132. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-63, отличающийся тем, что указанные в скобках аминокислотные остатки отсутствуют.

5 133. Полипептид по любому из пп. 64-114, отличающийся тем, что указанные в скобках аминокислотные остатки присутствуют.

134. Полипептид по любому из пп. 64-114, отличающийся тем, что указанные в скобках аминокислотные остатки отсутствуют.

10 135. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-63, отличающийся тем, что X1, X3 и X4, соответственно, содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична, соответственно, полной длине доменов X1, X2, X3 и X4, показанных ниже, при этом остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать:

15 X1: PKKKIQLHAENALYDALMILNI (SEQ ID NO:4)  
 X3: (LE)DYAFNFELILEEIARLF(ESG) (SEQ ID NO:5)  
 X4: (E)DEQEEMANAIITILQSWIFS (SEQ ID NO:6)

20 136. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-63, отличающийся тем, что X1, X3 и X4, соответственно, содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична, соответственно, полной длине доменов X1, X2, X3 и X4, показанных ниже, при этом остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать:

25 X1: QLHAENALYDALMILNI (SEQ ID NO:320)  
 X3: LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321)  
 X4: DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:322).

30 137. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-63, 135 и 136, отличающийся тем, что X2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине аминокислотной последовательности KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7), при этом остатки в скобках являются необязательными.

138. Условно активный агонист рецептора по любому из пп. 1-63, отличающийся тем, что X1, X2, X3 и X4, соответственно, содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична, соответственно, доменам X1, X2, X3 и X4, присутствующим в аминокислотной последовательности варианта 1 или варианта 2 SEQ ID NO:90, определенным в Таблице 1.

138. Полипептид по любому из пп. 64-114, 133 или 134, отличающийся тем, что X1, X3 и X4, соответственно, когда они присутствуют, содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична, соответственно, полной длине доменов X1, X2, X3 и X4, показанных ниже, при этом остатки в скобках могут присутствовать или отсутствовать:

X1: QLHAEHALYDALMILNI (SEQ ID NO:320)

X3: LEDYAFNFELILEEIARLFES (SEQ ID NO:321)

X4: DEQEEMANAIITILQSWIF(S) (SEQ ID NO:322).

139. Полипептид по любому из пп. 64-114, 133, 134 или 138, отличающийся тем, что X2, когда он присутствует, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентична полной длине аминокислотной последовательности KDEAEKAKRMKEWMKRIK(T) (SEQ ID NO:7), при этом остатки в скобках являются необязательными.

140. Полипептид по любому из пп. 64-114, 133, 134, отличающийся тем, что X1, X2, X3 и X4, когда они присутствуют, по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% идентичны, соответственно, доменам X1, X2, X3 и X4 (определенным в Таблице 1), присутствующим в аминокислотной последовательности варианта 1 или варианта 2 SEQ ID NO:90, определенных в Таблице 1.