(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202191117 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.15

(22) Дата подачи заявки
2019.10.23

(51) Int. Cl. *C07K 14/28* (2006.01)

(54) ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ Fc-СЛИТЫЕ БЕЛКИ

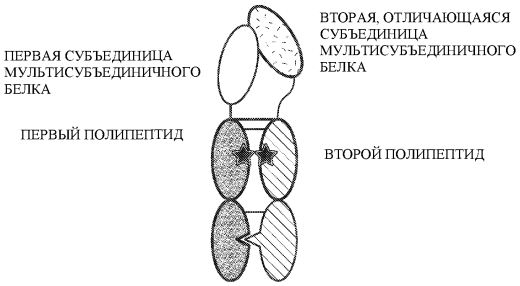
(31) **62/749,489; 62/781,898; 62/788,499; 62/827,347; 62/895,889**
(32) **2018.10.23; 2018.12.19; 2019.01.04; 2019.04.01; 2019.09.04**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/057721**
(87) **WO 2020/086758 2020.04.30**

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

(72) Изобретатель:
Чеунг Энн Ф., Куйллерот Жан-Мари, Гринберг Ася, Гутиеррез Ева, Хэйни Уильям, Вагтманн Николай (US)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М., Гизатуллина Е.М., Строкова О.В., Джермакян Р.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение обеспечивает конструкции Fc-слитых белков, которые в виде моновалентных димеров имеют более высокий период полужизни в сыворотке по сравнению с нативной/природной молекулой и, следовательно, являются предпочтительными для достижения более высоких титров белков во время производства, более высокой стабильности во время хранения и улучшенной эффективности при применении в качестве лекарственного препарата. Также обеспечены конструкции Fc-слитых белков, имеющие мутации в области Fc, которые снижают эффекторные функции, которые обладают повышенной активностью в отношении подавления роста опухоли и, следовательно, являются предпочтительными при применении в качестве противораковой терапии.



202191117 A1

202191117 A1

ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ FC-СЛИТЫЕ БЕЛКИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Для настоящей заявки испрашиваются преимущество и приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/749,489, поданной 23 октября 2018 года; по предварительной заявке на патент США №62/781,898, поданной 19 декабря 2018 года; по предварительной заявке на патент США №62/788,499, поданной 4 января 2019 года; по предварительной заявке на патент США № 62/827,347, поданной 1 апреля 2019 года; и по предварительной заявке на патент США №62/895,889, поданной 4 сентября 2019 года, раскрытие которых настоящим включено посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII, и настоящим полностью включен в данный документ посредством ссылки. Упомянутая ASCII-копия, созданная 22 октября 2019 года, называется DFY-063WO_SL.txt и имеет размер 946,355 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Изобретение в целом относится к гетеродимерным Fc-слитым белкам и фармацевтическим композициям, содержащим такие белки, и способам применения в лечении заболевания или расстройства у пациента-человека.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Недостатком физиологически активных белков является короткий период полужизни *in vivo*. Чтобы устранить данный недостаток, была предпринята попытка конъюгировать их с ПЭГ (полиэтиленгликоль) или тому подобным или слить их с областью Fc (crystallizable fragment, кристаллизующийся фрагмент) антитела. Белки, состоящие из двух или более различных субъединиц, где две или более различных субъединиц образуют белковый

комплекс для проявления физиологической активности, могут быть слиты с Fc-доменами дикого типа для получения форм Fc-слитых белков с образованием гомодимера за счет гомодимерной природы Fc. Белки, состоящие из двух или более различных субъединиц, в которых две или более различных субъединиц образуют белковый комплекс для проявления физиологической активности, также могут быть слиты с гетеродимерными областями Fc, полученными не только из IgG1, но также из других изотипических антител, таких как IgG2, IgG3 и IgG4, с образованием гетеродимерного Fc-слитого белка. Таким образом, одна или более субъединиц белка, который состоит из двух или более различных субъединиц и в котором две или более субъединиц проявляют физиологическую активность за счет образования белкового комплекса, могут быть слиты с концом участков гетеродимерного варианта Fc с образованием улучшенных форм Fc-слитого белка.

[0005] Гетеродимеризация Fc представляет собой технологию, которая индуцирует мутации в двух различных CH3-доменах Fc с помощью генной инженерии, так что два фрагмента Fc образуют гетеродимер с минимальными вариациями последовательности, в то время как они имеют третичные структуры, очень похожие на структуры встречающихся в природе антител (см., например, патент США № 7,695,936).

[0006] Изобретения, описанные в настоящем раскрытии, обеспечивают конструкции для улучшения форм Fc-слитых белков, в которых две субъединицы гетеродимерного белка соединены с двумя доменами Fc, имеющими различные гетеродимеризационные домены, путем введения линкеров различной длины или мутаций в CH2- и CH3-доменах в Fc.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Изобретение в целом относится к гетеродимерным Fc-слитым белкам и фармацевтическим композициям, содержащим такие белки.

[0008] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела (first antibody Fc domain polypeptide) и первую субъединицу мультисубъединичного белка; и второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела (second antibody Fc domain polypeptide) и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка, причем первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат различные мутации, способствующие

гетеродимеризации, причем первый и/или второй полипептиды Fc-домена антитела включают одну или несколько мутаций, которые снижают эффекторную функцию Fc, и при этом первая субъединица и вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка связаны друг с другом.

[0009] В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция включает способность полипептида Fc-домена вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность (**ADCC**), антителозависимый клеточный фагоцитоз (**ADCP**) и/или комплементзависимую цитотоксичность (**CDC**). В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена антитела человека. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD или IgE (например, человеческий IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, или полипептиды Fc-домена IgE). В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций в положении(ях) 233, 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, 329, 330 и/или 331 по нумерации ЕС. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок является фукозилированным. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций в положении(ях) 234, 235, 237, 329, 330 и/или 331 по нумерации ЕС. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций, выбранных из L234A, L235A, L235E, G237A, P329A, A330S и P331S. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L234A и L235A. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L234A, L235A и P329A. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L234A, L235E, G237A, A330S и P331S. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию C220S.

[0011] В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну

или несколько мутаций в положении(ях) 235 и/или 329 по нумерации ЕС. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций, выбранных из L235E и P329A. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию L235E. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L235E и P329A. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию S228P.

[0012] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291.

[0013] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему субъединицу мультисубъединичного цитокина и полипептид Fc-домена иммуноглобулина; полипептид Fc-домена содержит мутации, способствующие гетеродимеризации с другим полипептидом Fc-домена иммуноглобулина, и одну или несколько мутаций, которые снижают эффекторную функцию Fc. Например, полипептид Fc-домена, содержащий мутации, может быть полипептидом Fc-домена человеческого антитела IgG1.

[0014] В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мутаций, которые снижают эффекторную функцию Fc, выбраны из L234A, L235A или L235E, G237A, P329A, A330S и P331S, где нумерация соответствует системе нумерации ЕС. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения мутации, снижающие эффекторную функцию Fc, представляют собой L234A, L235A и P329A, где нумерация соответствует системе нумерации ЕС.

[0015] В некоторых вариантах осуществления мутации, способствующие гетеродимеризации, представляют собой K360E и K409W, где нумерация соответствует системе нумерации ЕС. В некоторых других вариантах осуществления мутации, способствующие гетеродимеризации, представляют собой Q347R, D399V и F405T, где нумерация соответствует системе нумерации ЕС.

[0016] В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc-домена дополнительно содержит мутацию, способствующую образованию дисульфидной связи с другим полипептидом Fc-домена иммуноглобулина. Например, когда мутациями

гетеродимеризации являются K360E и K409W, в некоторых вариантах осуществления мутация, способствующая образованию дисульфидной связи, представляет собой Y349C, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EC. Когда мутациями гетеродимеризации являются Q347R, D399V и F405T, в некоторых вариантах осуществления мутация, способствующая образованию дисульфидной связи, представляет собой S354C, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EC.

[0017] Например, в некоторых вариантах осуществления полипептид, содержащий субъединицу мультисубъединичного цитокина и полипептид Fc-домена иммуноглобулина, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291.

[0018] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290 или SEQ ID NO: 291. В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290 или SEQ ID NO: 291. В одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290 или SEQ ID NO: 291, или экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290 или SEQ ID NO: 291.

[0019] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий первый полипептид Fc-домена и второй, отличающийся полипептид Fc-домена Fc иммуноглобулина, а также первую субъединицу и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка, где первая субъединица и вторая, отличающаяся субъединица связаны друг с другом и связаны с одним или несколькими концом(ами) N-конца или C-конца первого полипептида Fc-домена и/или второго, отличающегося полипептида Fc-домена; где первый полипептид Fc-домена и второй полипептид Fc-домена мутированы таким образом, чтобы способствовать образованию гетеродимерного Fc и снижать эффекторную функцию Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультисубъединичный белок представляет собой IL-12 (например, человеческий IL-12), так что в гетеродимерном слитом с Fc белке субъединицы

p35 и p40 IL-12 связаны друг с другом и связаны с одним или несколькими концом(ами) N-конца или C-конца первого полипептида Fc-домена и/или второго полипептида Fc-домена; где первый полипептид Fc-домена и второй полипептид Fc-домена мутированы таким образом, чтобы способствовать образованию гетеродимерного Fc и снижать эффекторную функцию Fc.

[0020] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий: первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела, и второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела, связанный с первым полипептидом Fc-домена антитела, где первый полипептид дополнительно содержит первую субъединицу мультисубъединичного белка, слитую линкером, содержащим аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 237) или EPKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 6), с первым полипептидом Fc-домена антитела, где X_1 представляет L или A, X_2 представляет L, E или A, и X_3 представляет A или G; вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела, и субъединицы мультисубъединичного белка связаны друг с другом; когда X_1 представляет L и/или X_2 представляет L, по меньшей мере один из первого полипептида Fc-домена антитела и второго полипептида Fc-домена антитела содержит мутацию Q347R, способствующую гетеродимеризации.

[0021] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, содержит аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239) или EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239) или EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 9).

[0022] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:

10) или GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 244). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 10) или GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 244).

[0023] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, содержит аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 238) или EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, сливающий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 238) или EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 7).

[0024] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 8) или GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 241). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 8) или GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 241).

[0025] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 15) или GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 242). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной

последовательности GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 15) или GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 242).

[0026] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 16) или GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 243). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 16) или GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 243).

[0027] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 65) или GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 245). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 65) или GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 245).

[0028] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 66) или GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 246). В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 66) или GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 246).

[0029] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, содержит аминокислотную последовательность

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 11) или PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 240). В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, сливающий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 11) или PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 240).

[0030] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 12) или GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 247). В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 12) или GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 247).

[0031] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 67) или GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 248). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 67) или GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 248).

[0032] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 68) или GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 249). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной

последовательности GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 68) или GGGGS GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 249).

[0033] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий субъединицу мультисубъединичного цитокина, соединенную с полипептидом Fc-домена иммуноглобулина линкером, содержащим аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239); полипептид Fc-домена содержит мутации, способствующие гетеродимеризации с другим полипептидом Fc-домена иммуноглобулина, и замены L234A, L235A и P329A для снижения эффекторной функции Fc.

[0034] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий субъединицу p40 человеческого IL-12, соединенную с первым полипептидом Fc-домена человеческого IgG1 (hlgGl) линкером, содержащим аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239) или состоящим из нее, и субъединицу p35 человеческого IL-12, соединенную со вторым полипептидом Fc-домена hlgGl линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 10) или состоящим из нее; первый и второй полипептиды Fc-домена содержат мутации, способствующие гетеродимеризации, и замены L234A, L235A и P329A для снижения эффекторной функции Fc hIgG1.

[0035] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий: первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела, и второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела, где первый полипептид дополнительно содержит первую субъединицу мультисубъединичного белка, при этом последовательность белка слита линкером, содержащим аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG (SEQ ID NO: 1), с первым полипептидом Fc-домена антитела, где X представляет L или E; вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела, и субъединицы мультисубъединичного белка связаны друг с другом, первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела содержат различные мутации, способствующие гетеродимеризации, и первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела связаны друг с другом.

[0036] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению включает первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела, и второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела, где первый полипептид дополнительно содержит первую субъединицу. мультисубъединичного белка, при этом последовательность белка слита с помощью линкера с первым полипептидом Fc-домена антитела; и второй полипептид дополнительно содержит вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка, при этом последовательность белка слита с помощью линкера со вторым полипептидом Fc-домена антитела. Линкер, соединяющий белковую последовательность второй, отличающейся субъединицы мультисубъединичного белка со вторым полипептидом Fc-домена антитела, может включать G4S (SEQ ID NO: 110), (G4S)2 (SEQ ID NO: 109) или (G4S)3 (SEQ ID NO: 108).

[0037] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, содержит аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления линкер, сливающий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 2).

[0038] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3).

[0039] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита с полипептидом Fc-домена второго антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена

антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 13).

[0040] В некоторых вариантах вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита с полипептидом Fc-домена второго антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита с полипептидом Fe-домена второго антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 14).

[0041] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, содержит аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления линкер, сливающий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 4).

[0042] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 5).

[0043] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 63). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 63).

[0044] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 64). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 64).

[0045] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки, описанные в данном документе, включают первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG4, каждый из которых мутирован, чтобы способствовать их гетеродимеризации друг с другом. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает одну или несколько мутаций, выбранных из K370E и R409W, и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает одну или несколько мутаций, выбранных из E357N, D399V и F405T. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает одну или несколько мутаций, выбранных из E357N, D399V и F405T, и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает одну или несколько мутаций, выбранных из K370E и R409W. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает мутации K370E и R409W, и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает мутации E357N, D399V и F405T. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает мутации E357N, D399V и F405T, и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает мутации K370E и R409W. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена IgG4 включает одну или несколько мутаций, выбранных из K360E и R409W, и второй, отличающийся полипептид Fc-домена IgG4 включает одну или несколько мутаций, выбранных из Q347R, D399V и F405T. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена IgG4 включает одну или несколько мутаций, выбранных из Q347R, D399V и F405T, и второй, отличающийся полипептид Fc-домена IgG4 включает одну или несколько мутаций, выбранных из K360E и R409W. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена IgG4 включает мутации K360E и R409W, и второй, отличающийся полипептид Fc-домена IgG4 включает мутации Q347R, D399V и F405T. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена IgG4 включает

мутации Q347R, D399V и F405T, и второй, отличающийся полипептид Fc-домена IgG4 включает мутации K360E и R409W.

[0047] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок, описанный в данном документе, содержит полипептиды Fc-домена IgG4 или IgG1, дополнительно мутированные для снижения эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию P329G или P329A. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG4, каждый, содержат мутацию P329G или P329A. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG1 и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG1, каждый, содержат мутацию P329G или P329A. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG4, каждый, содержат мутацию P329A. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG1 и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG1, каждый, содержат мутацию P329A.

[0048] В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе гетеродимерное слияние на основе Fc включает первый полипептид Fc-домена антитела IgG1 и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG1, каждый из которых содержит мутацию, выбранную из A330S и P331S. В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе гетеродимерное слияние на основе Fc включает первый полипептид Fc-домена антитела IgG1 и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG1, каждый из которых содержит мутации A330S и P331S.

[0049] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе гетеродимерный белок на основе Fc включает полипептиды Fc-домена IgG4 или IgG1, которые дополнительно мутированы для введения межцепочечной дисульфидной связи. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена IgG4 или IgG1 включает мутацию Y349C, и второй, отличающийся полипептид Fc-домена IgG4 или IgG1 включает мутацию S354C. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена IgG4 или IgG1 включает мутацию S354C, и второй, отличающийся полипептид Fc-домена IgG4 или IgG1 включает мутацию Y349C.

[0050] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению включают нативную дисульфидную связь между первой субъединицей мультисубъединичного белка и второй, отличающейся субъединицей мультисубъединичного белка. Например, в типичном варианте осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по изобретению включает нативную гетеродимерную дисульфидную связь между субъединицами p35 и p40 IL-12. Такой белок включает нативную дисульфидную связь между C74 p35 и C177 p40.

[0051] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению включают искусственную или сконструированную гетеродимерную дисульфидную связь между первой субъединицей мультисубъединичного белка и второй, отличающейся субъединицей мультисубъединичного белка. Например, в типичном варианте осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок согласно изобретению включает искусственную или сконструированную гетеродимерную дисульфидную связь между субъединицами p35 и p40 IL-12. Такой белок включает искусственную или сконструированную дисульфидную связь между V185C p35 и Y292C p40.

[0052] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению включают нативную дисульфидную связь между первой субъединицей мультисубъединичного белка и второй, отличающейся субъединицей мультисубъединичного белка, а также искусственную или сконструированную гетеродимерную дисульфидную связь между первой субъединицей мультисубъединичного белка и второй, отличающейся субъединицей мультисубъединичного белка. Например, в типичном варианте осуществления нативная гетеродимерная дисульфидная связь имеется между субъединицами p35 и p40 IL-12 и включает искусственную или сконструированную гетеродимерную дисульфидную связь между субъединицами p35 и p40 IL-12. Такой белок включает нативную дисульфидную связь между C74 p35 и C177 p40 и искусственную или сконструированную дисульфидную связь между V185C p35 и Y292C p40.

[0053] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению сконструированы так, чтобы удалить нативную дисульфидную связь и затем заменить ненативной искусственной или сконструированной дисульфидной связью. Например, в типичном варианте осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок согласно изобретению включает p35 IL-12, в которой нативный C74 мутирован в серин, и p40 IL-12, в которой нативный C177 мутирован в серин, тем самым удаляя нативную дисульфидную связь между субъединицами p35 и p40 IL-12. В данный мутированный IL-12 вводятся две новые мутации,

V185C на p35 и Y292C на p40, тем самым вводя ненативную искусственную или сконструированную дисульфидную связь.

[0054] Внутри гетеродимерного Fc-слитого белка по настоящему изобретению первый полипептид и второй, отличающийся полипептид содержат первую субъединицу и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного цитокина, соответственно. Внутри гетеродимерного Fc-слитого белка по настоящему изобретению первый полипептид и второй, отличающийся полипептид содержат первую субъединицу и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного цитокина, соответственно. В типичном варианте осуществления цитокин представляет собой IL-12 (например, человеческий IL-12). Также обеспечиваются составы, содержащие любой из описанных в данном документе гетеродимерных Fc-слитых белков, клетки, содержащие одну или несколько нуклеиновых кислот, экспрессирующих гетеродимерные Fc-слитые белки, или вектор(ы), экспрессирующие гетеродимерный Fc-слитый белок, и способы увеличения гибели опухолевой клетки с использованием гетеродимерных Fc-слитых белков. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает состав, который включает описанный в данном документе гетеродимерный Fc-слитый белок и фармацевтически приемлемый носитель.

[0055] В другом аспекте гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один вариабельный домен антитела (например, вариабельный домен тяжелой цепи антитела). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один вариабельный домен тяжелой цепи антитела связан с вариабельной областью легкой цепи антитела с образованием Fab, и вариабельный домен тяжелой цепи или вариабельный домен легкой цепи Fab слит с N-концом первого полипептида Fc-домена антитела и/или второго полипептида Fc-домена антитела.

[0056] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий по меньшей мере один вариабельный домен антитела по настоящему изобретению, имеет первую субъединицу мультисубъединичного белка и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка, соединенную с C-концом первого полипептида Fc-домена антитела и полипептида Fc-домена второго антитела, соответственно.

[0057] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий по меньшей мере один вариабельный домен антитела по настоящему

изобретению, имеет первую субъединицу мультисубъединичного белка и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка, соединенную с С-концом второго полипептида Fc-домена антитела и первого полипептида Fc-домена антитела, соответственно.

[0058] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела, расположенный на С-конце по отношению к первому полипептиду Fc-домена антитела первого полипептида. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела, расположенный на С-конце по отношению ко второму полипептиду Fc-домена антитела второго полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи антитела связана с вариабельной областью легкой цепи антитела с образованием scFv. В некоторых вариантах осуществления первая субъединица мультисубъединичного белка и вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка соединены с N-концом первого полипептида Fc-домена антитела и второго полипептида Fc-домена антитела, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первая субъединица мультисубъединичного белка и вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка соединены с N-концом второго полипептида Fc-домена антитела и первого полипептида Fc-домена антитела, соответственно.

[0059] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению не содержит вариабельный домен антитела. Например, в некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок состоит из или состоит по существу из первой субъединицы мультисубъединичного белка (например, белка IL-12), линкера, необязательно содержащего спейсерный пептид, и первого полипептида Fc-домена антитела; и второй, отличающейся субъединицы мультисубъединичного белка (например, белка IL-12), линкера, необязательно содержащего спейсерный пептид, и второго полипептида Fc-домена антитела.

[0060] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению дополнительно содержит протеогликан-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления протеогликан-связывающий домен связывает один или несколько протеогликанов, которые специфически экспрессируются в опухоли. В некоторых вариантах осуществления протеогликан-связывающий домен связывает один

или несколько протеогликанов, выбранных из синдекана, серглицина, CSPG4, бетагликана, глипикана, перлекана, версикана, бревикана и небольших протеогликанов, богатых лейцином (SLRP). В некоторых вариантах осуществления SLRP выбраны из декорина, бигликана, аспорина, фибродулина и люмикана. В некоторых вариантах осуществления протеогликан-связывающий домен соединен с С-концом первого полипептида Fc-домена антитела. В некоторых вариантах осуществления протеогликан-связывающий домен соединен с С-концом второго полипептида Fc-домена антитела.

[0061] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный слитый с Fc белок по настоящему изобретению дополнительно содержит коллаген-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления коллаген-связывающий домен связывает один или несколько коллагенов, которые специфически экспрессируются в опухоли. В некоторых вариантах осуществления коллагена-связывающий домен соединен с С-концом первого полипептида Fc-домена антитела. В некоторых вариантах осуществления коллаген-связывающий домен соединен с С-концом второго полипептида Fc-домена антитела.

[0062] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению дополнительно содержит связывающий гиалуроновую кислоту домен. В некоторых вариантах осуществления связывающий гиалуроновую кислоту домен соединен с С-концом полипептида первого Fc-домена антитела. В некоторых вариантах осуществления связывающий гиалуроновую кислоту домен соединен с С-концом второго полипептида Fc-домена антитела.

[0063] Другой аспект изобретения относится к способу лечения рака у пациента. Способ включает введение пациенту, например пациенту, который в этом нуждается, эффективного количества описанного в данном документе гетеродимерного Fc-слитого белка или состава, который включает эффективное количество описанного в данном документе мультиспецифического связывающего белка. Например, в некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение пациенту, например пациенту, нуждающемуся в лечении, композиции, которая включает эффективное количество описанного в данном документе гетеродимерного Fc-слитого белка и фармацевтически приемлемого носителя.

[0064] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака, при этом способ включает введение пациенту только однократной дозы

гетеродимерного IL-12-Fc-слитого белка. В некоторых вариантах осуществления однократная доза находится в количестве, достаточном для индукции полного ответа против рака. В некоторых вариантах осуществления однократная доза находится в количестве, достаточном для отсрочки или предотвращения рецидива рака.

[0065] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака, при этом способ включает введение пациенту только однократной дозы гетеродимерного IL-12-Fc-слитого белка, содержащего первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291, или состава, содержащего гетеродимерный IL-12-Fc-слитый белок и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления однократная доза гетеродимерного IL-12-Fc-слитого белка, содержащего первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291, или состав, содержащий гетеродимерный IL-12-Fc-слитый белок и фармацевтически приемлемый носитель, находится в количестве, достаточном для индукции полного ответа против рака. В некоторых вариантах осуществления однократная доза находится в количестве, достаточном для отсрочки или предотвращения рецидива рака.

[0066] Другой аспект изобретения относится к способу лечения острого лучевого синдрома, где способ включает введение пациенту гетеродимерного Fc-слитого белка или состава, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления острый лучевой синдром включает один или несколько синдромов, выбранных из гематопоэтического лучевого синдрома, желудочно-кишечного лучевого синдрома, нейроваскулярного лучевого синдрома и кожного лучевого синдрома. В некоторых вариантах осуществления острый лучевой синдром включает синдром, выбранный из группы, состоящей из гематопоэтического лучевого синдрома, желудочно-кишечного лучевого синдрома, нейроваскулярного лучевого синдрома и кожного лучевого синдрома.

[0067] Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает гетеродимерные слитые с Fc белковые конструкции мультисубъединичных белков. Данные конструкции слитых белков могут демонстрировать более высокий период полужизни в сыворотке по сравнению с нативным/природным мультисубъединичным белком, улучшенный выход во время

продуцирования, повышенную стабильность во время хранения и/или повышенную эффективность при применении в качестве лекарственного препарата.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0068] ФИГ. 1А иллюстрирует типичный гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий первую субъединицу мультисубъединичного белка, соединенную линкером с первым полипептидом Fc-домена антитела, и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка, соединенную линкером со вторым полипептидом Fc-домена антитела. Первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела, каждый, содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации, и дисульфидная связь между полипептидами Fc-доменов стабилизирует гетеродимер. Линкер, соединяющий дополнительную субъединицу со вторым полипептидом Fc-домена антитела, может включать последовательность (G4S)3 (SEQ ID NO: 108).

[0069] ФИГ. 1В иллюстрирует типичный гетеродимерный Fc-слитый белок, аналогичный белку, показанному на ФИГ. 1А, но также включающий мутации в полипептиде Fc-домена для снижения связывания FcγR.

[0070] ФИГ. 1С иллюстрирует типичный белок, в котором вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка соединена линкером с первым полипептидом Fc-домена антитела, и другая субъединица мультисубъединичного белка соединена другим линкером со вторым полипептидом Fc-домена антитела.

[0071] ФИГ. 1D иллюстрирует типичный гетеродимерный Fc-слитый белок, аналогичный белку, показанному на ФИГ. 1С, но также включающий мутации в полипептиде Fc-домена для снижения связывания FcγR.

[0072] ФИГ. 1Е иллюстрирует типичный гетеродимерный Fc-слитый белок, аналогичный белку, показанному на ФИГ. 1В, за исключением того, что вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка расположена на С-конце второго полипептида Fc-домена антитела во втором полипептиде.

[0073] ФИГ. 1F иллюстрирует типичный гетеродимерный Fc-слитый белок, аналогичный белку, показанному на ФИГ. 1Е, за исключением того, что вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка расположена на С-конце первого полипептида Fc-домена антитела в первом полипептиде.

[0074] ФИГ. 2А иллюстрирует типичный гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий первую субъединицу мультисубъединичного белка, соединенную линкером с первым полипептидом Fc-домена антитела, и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка, соединенную другим линкером со вторым полипептидом Fc-домена антитела, где субъединицы соединены двумя дисульфидными связями. Первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела, каждый, содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации, и дисульфидная связь между полипептидами Fc-доменов стабилизирует гетеродимер. Проиллюстрированный белок также включает мутации в полипептиде Fc-домена для снижения связывания FcγR.

[0075] ФИГ. 2В иллюстрирует типичный гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий первую субъединицу мультисубъединичного белка, соединенную линкером с первым полипептидом Fc антитела, и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка, соединенную другим линкером со вторым полипептидом Fc-домена антитела, где субъединицы связаны одной ненативной дисульфидной связью. В показанном примере белка нативная дисульфидная связь удалена и заменена искусственной дисульфидной связью. Например, конструкция IL-12 может включать мутации p35-V185C/C74S и p40-Y292C/Cl77S. Первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела, каждый, содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации, и дисульфидная связь между полипептидами Fc-домена стабилизирует гетеродимер. Белок также включает мутации в полипептиде Fc-домена для снижения связывания FcγR.

[0076] ФИГ. 3А иллюстрирует типичный гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий первую субъединицу мультисубъединичного белка, соединенную линкером с первым полипептидом Fc-домена антитела, и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка, соединенную другим линкером, имеющим такую же аминокислотную последовательность, со вторым полипептидом Fc-домена антитела. Первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела, каждый, содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации, и дисульфидная связь между полипептидами Fc-домена стабилизирует гетеродимер.

[0077] ФИГ. 3В иллюстрирует типичный гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий первую субъединицу мультисубъединичного белка, соединенную линкером с первым полипептидом Fc-домена антитела, и вторую, отличающуюся субъединицу

мультисубъединичного белка, соединенную другим линкером со вторым полипептидом Fc-домена антитела. Первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела, каждый, содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации, и дисульфидная связь между полипептидами Fc-домена стабилизирует гетеродимер. Линкер, соединяющий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка со вторым полипептидом Fc-домена антитела, может включать последовательность (G4S)4 (SEQ ID NO: 109) или G4S (SEQ ID NO: 110).

[0078] На **ФИГ. 4A-4L** показаны иллюстративные конструкции гетеродимерного Fc-слитого белка слияния с scFv (ФИГ. 4A-4H) и конструкции слитого гетеродимерного Fc-слитого белка слияния с mAb (ФИГ. 4I-4L), в которых первая субъединица мультисубъединичного белка соединена линкером с первым полипептидом Fc-домена антитела и вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка соединена другим линкером со вторым полипептидом Fc-домена антитела.

[0079] **ФИГ.4A-4D** иллюстрируют типичные Fc-слитые белки, включая первый scFv, связанный с C-концом первого полипептида Fc-домена антитела, и второй scFv, связанный с C-концом второго полипептида Fc-домена антитела. Первый scFv и второй scFv могут быть одинаковыми или различными (например, связываться с различными антигенами или различными эпитопами одного антигена). Типичные Fc-слитые белки, показанные на ФИГ. 4A и ФИГ. 4C, содержат различные пары вариантов гетеродимеризации Fc. Типичные Fc-слитые белки, показанные на ФИГ. 4B и ФИГ. 4D, включают различные пары вариантов гетеродимеризации Fc. Например, если гетеродимеризационные мутации включают мутации типа «выступы-во-впадины (knobs-into-holes)», на ФИГ. 4A и ФИГ. 4D показаны типичные Fc-слитые белки, в которых первый полипептид содержит мутацию(и) «впадина», и второй полипептид содержит мутацию(и) «выступ»;

ФИГ. 4B и ФИГ. 4C иллюстрируют типичные Fc-слитые белки, в которых первый полипептид содержит мутацию(и) «выступ», и второй полипептид содержит мутацию(и) «впадина». ФИГ. 4A и ФИГ. 4B иллюстрируют типичные Fc-слитые белки, в которых белковая последовательность первой субъединицы мультисубъединичного белка соединена с первым полипептидом; ФИГ. 4C и ФИГ. 4D иллюстрируют типичные Fc-слитые белки, в которых вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка соединена с

первым полипептидом. Аналогичным образом рассматриваются гетеродимерные Fc-слитые белки с другими типами гетеродимеризационных мутаций.

[0080] ФИГ. 4E и 4G иллюстрируют типичные Fc-слитые белки, включающие scFv, связанный с C-концом первого полипептида Fc-домена антитела.

[0081] ФИГ. 4F и 4H иллюстрируют типичные Fc-слитые белки, включающие scFv, связанный с C-концом второго полипептида Fc-домена антитела.

[0082] ФИГ. 4I-4L иллюстрируют типичные Fc-слитые белки, включающие первый Fab, связанный с N-концом первого полипептида Fc-домена антитела, и второй Fab, связанный с N-концом второго полипептида Fc-домена антитела. ФИГ. 41 и ФИГ. 4K иллюстрируют типичные Fc-слитые белки, в которых первая субъединица мультисубъединичного белка соединена с первым полипептидом; ФИГ. 4J и ФИГ. 4L иллюстрируют типичные Fc-слитые белки, в которых вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка соединена с первым полипептидом.

ФИГ. 4K отличается от ФИГ. 4L, имея более длинную аминокислотную последовательность (например, описанный в данном документе спейсерный пептид), которая связывает полипептид Fc-домена антитела и первую субъединицу мультисубъединичного белка; ФИГ. 4J отличается от ФИГ. 4L, имея более длинную аминокислотную последовательность (например, описанный в данном документе спейсерный пептид), которая связывает полипептид Fc-домена антитела и первую субъединицу мультисубъединичного белка.

[0083] ФИГ. 5A-5C представляют собой графики, показывающие кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26 и обработанных рекомбинантным мышиным IL-12 (rmIL-12) (ФИГ. 5A), DF-mIL-12-Fc wt (ФИГ. 5B), DF-mIL-12-Fc si (ФИГ. 5C) или изотипным контролем mIgG2a один раз в неделю.

[0084] ФИГ. 6 представляет собой график, показывающий кривые выживаемости Каплана-Мейера для мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26 и обработанных rmIL-12, DF-mIL-12-Fc wt, DF-mIL-12-Fc si или изотипным контролем mIgG2a один раз в неделю.

[0085] ФИГ. 7A-7D представляют собой графики, показывающие кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26 и обработанных DF-mIL-12-Fc wt в молярном эквиваленте 1 мкг rmIL-12 (ФИГ. 7A), DF-mIL-12-Fc si в молярном эквиваленте 1 мкг rmIL-12 (ФИГ. 7B), DF-mIL-12-Fc wt в молярном эквиваленте 0,1 мкг

rmIL-12 (ФИГ. 7C), DF-mIL-12-Fc si в молярном эквиваленте 0,1 мкг rmIL-12 (ФИГ. 7D) или изотипным контролем mIgG2a один раз в неделю.

[0086] ФИГ. 8 представляет собой график, показывающий кривые выживаемости Каплана-Мейера мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26 и обработанных DF-mIL-12-Fc wt в молярном эквиваленте 1 мкг rmIL-12, DF-mIL-12-Fc si в молярном эквиваленте 1 мкг rmIL-12, DF-mIL-12-Fc wt в молярном эквиваленте 0,1 мкг rmIL-12, DF-mIL-12-Fc si в молярном эквиваленте 0,1 мкг rmIL-12 или изотипным контролем mIgG2a раз в неделю.

[0087] ФИГ. 9A-9C представляют собой графики, показывающие кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных клетками меланомы B16F10 и обработанных rmIL-12 (ФИГ. 9A), DF-mIL-12-Fc wt (ФИГ. 9B), DF-mIL-12-Fc si (ФИГ. 9C) или изотипным контролем mIgG2a один раз в неделю.

[0088] ФИГ. 10 представляет собой график, показывающий кривые выживаемости Каплана-Мейера мышей, инокулированных клетками меланомы B16F10 и обработанных rmIL-12, DF-mIL-12-Fc wt, DF-mIL-12-Fc si или изотипным контролем mIgG2a один раз в неделю.

[0089] ФИГ. 11A-11D представляют собой графики, показывающие кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных клетками меланомы B16F10 и обработанных DF-mIL-12-Fc wt в молярном эквиваленте 0,5 мкг rmIL-12 (ФИГ. 11A), DF-mIL-12-Fc si в молярном эквиваленте 0,5 мкг rmIL-12 (ФИГ. 11B), DF-mIL-12-Fc wt в молярном эквиваленте 0,1 мкг rmIL-12 (ФИГ. 11C), DF-mIL-12-Fc si в молярном эквиваленте 0,1 мкг rmIL-12 (ФИГ. 11D) или изотипным контролем mIgG2a один раз в неделю.

[0090] ФИГ. 12 представляет собой график, показывающий кривые выживаемости Каплана-Мейера мышей, инокулированных клетками меланомы B16F10 и обработанных DF-mIL-12-Fc wt в молярном эквиваленте 0,5 мкг rmIL-12, DF-mIL-12-Fc si молярном эквиваленте 0,5 мкг rmIL-12, DF-mIL-12-Fc wt в молярном эквиваленте 0,1 мкг rmIL-12, DF-mIL-12-Fc si в молярном эквиваленте 0,1 мкг rmIL-12 или изотипным контролем mIgG2a раз в неделю.

[0091] ФИГ. 13A представляет собой график, показывающий ответ IL-12 на лечение DF-hIL-12-Fc si (DF IL-12-Fc) или рекомбинантным человеческим IL-12 (rhIL-12) с использованием анализа с репортерными клетками HEK-Blue IL-12.

[0092] ФИГ. 13B представляет собой график, показывающий продукцию IFN-γ мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) в ответ на лечение DF-hIL-12-Fc si (DF IL-12-Fc) и rhIL-12.

[0093] ФИГ. 14 представляет собой график, показывающий относительные концентрации в плазме крови для DF-hIL-12-Fc si, rhIL-12 и IFN-γ в плазме K2 EDTA яванского макака после однократного внутривенного введения эквимолярных количеств DF-hIL-12-Fc si или rhIL-12 дикого типа в концентрации 10 мкг/кг.

[0094] ФИГ. 15A-15B представляют собой графики, показывающие PK/PD профиль для rmTE-12 (ФИГ. 15A) и DF-mIL-12-Fc si (ФИГ. 15B) у нелеченных мышей Balb/c. ФИГ. 15A показывает PK/PD профиль rmTE-12 у нелеченных мышей Balb/c, и на ФИГ. 15B показан PK/PD профиль DF-mIL-12-Fc si у нелеченных мышей Balb/cIL-12. Уровни IL-12 и IFN-γ в сыворотке крови анализировали с помощью ELISA. ФИГ. 15C представляет собой график, показывающий PK/PD профиль DF-mIL-12-Fc si, вводимого внутривенно нелеченным мышам Balb/c. ФИГ. 15D представляет собой график, показывающий PK/PD профиль DF-mIL-12-Fc si, введенного внутрибрюшинно, у нелеченных мышей Balb/c. ФИГ. 15E представляет собой график, показывающий PK/PD профиль DF-mIL-12-Fc si, вводимого подкожно, у нелеченных мышей Balb/c. Средние сывороточные уровни представляют собой среднее значение ± SEM.

[0095] ФИГ. 16A-16C представляют собой графики, показывающие кривые роста опухоли мышей с опухолью B16F10, получавших DF-mIL-12-Fc si, анти-PD-1 или их комбинацию. Мышам внутрибрюшинно вводили 0,5 мкг изотипического контроля или 0,5 мкг DF-mIL-12-Fc si (ФИГ. 16A), изотипический контроль или анти-PD-1 (ФИГ. 16B) и изотипический контроль или DF-mIL-12-Fc si/анти-PD-1 (ФИГ. 16C). Животным вводили один раз в неделю DF-mIL-12-Fc si и два раза в неделю анти-PD-1, как указано выше. Рост опухоли оценивали в течение 60 дней. На графиках показаны кривые роста опухоли у отдельных мышей.

[0096] ФИГ. 17A-17B представляют собой графики, показывающие выживаемость и массу тела мышей с опухолью B16F10, получавших DF-mIL-12-Fc si, анти-PD-1 или их комбинацию. Мышей лечили изотипом, DF-mIL-12-Fc si, анти-PD-1 или комбинацией DF-mIL-12-Fc si и анти-PD-1. Животным вводили один раз в неделю 0,5 мкг DF-mIL-12-Fc si и дважды еженедельно 200 мкг анти-PD-1 или изотипа. ФИГ. 17A показывает кривые

выживаемости Каплана-Мейера. ФИГ. 17B показывает массу тела мышей как средние значения ± стандартное отклонение.

[0097] ФИГ. 18A-18C представляют собой графики, показывающие кривые роста опухоли мышей с опухолью B16F10, получавших DF-mIL-12-Fc si, mcFAE-C26.99 TriNKET или их комбинацию. Мышам внутрибрюшинно вводили 150 мкг изотипического контроля или 0,5 мкг DF-mIL-12-Fc si (ФИГ. 18A), изотипический контроль или 150 мкг TriNKET (ФИГ. 18B) и изотипический контроль или DF-mIL-12-Fc si./TriNKET (ФИГ. 18C). Животным вводили один раз в неделю DF-mIL-12-Fc si и трижды в неделю TriNKET, как указано выше. Рост опухоли оценивали в течение 72 дней. На графиках показаны кривые роста опухоли у отдельных мышей.

[0098] ФИГ. 19A-19B представляют собой графики, показывающие выживаемость и массу тела мышей с опухолью B16F10, получавших DF-mIL-12-Fc si, mcFAE-C26.99 TriNKET или их комбинацию. Мышей лечили изотипом, DF-mIL-12-Fc si, TriNKET или комбинацией DF-mIL-12-Fc si и TriNKET. Животным вводили один раз в неделю 0,5 мкг DF-mIL-12-Fc si и трижды в неделю 150 мкг TriNKET или изотипа. ФИГ. 19A показывает кривые выживаемости Каплана-Мейера. ФИГ. 19B показывает массу тела мышей как средние значения + стандартное отклонение.

[0099] ФИГ. 20 представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли мышей с полным ответом (CR) из эксперимента с моделью опухоли B16F10 на ФИГ.18, получавших комбинированную терапию DF-mIL-12-Fc si/TriNKET (n = 3), повторно зараженных приживлением с $2x10^5$ клетками меланомы B16F10.

[00100] ФИГ. 21A представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26, и которым вводили однократную дозу DF-mIL-12-Fc si или изотипа mIgG2a.

[00101] ФИГ. 21B представляет собой график, показывающий массы тела ± стандартное отклонение мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26, и которым еженедельно вводили дозу DF-mIL-12-Fc si, изотипа mIgG2a или rmIL-12.

[00102] ФИГ. 21C представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли у повторно зараженных отдельных мышей, которые были либо нелеченными, либо с полным

ответом (CR), когда им ранее вводили однократную дозу DF-mIL-12-Fc si в модели опухоли CT26.

[00103] ФИГ. 22A-22B представляют собой графики, показывающие кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26, и которым еженедельно вводили дозу изотипа DF-mIL-12-Fc si или mIgG2a либо внутрибрюшинно (IP) (ФИГ. 22A), либо подкожно (SC) (ФИГ. 22B).

[00104] ФИГ. 23 представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных клетками меланомы B16F10, и которым вводили однократную дозу изотипа DF-mIL-12-Fc si или mIgG2a.

[00105] ФИГ. 24A-24B представляют собой графики, показывающие кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных клетками меланомы B16F10, и которым еженедельно вводили дозу изотипа DF-mIL-12-Fc si или mIgG2a либо внутрибрюшинно (IP) (ФИГ. 24A), либо подкожно (SC) (ФИГ. 24B).

[00106] ФИГ. 25A-25B представляют собой графики, показывающие кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26, и которым внутрибрюшинно вводили однократную дозу (ФИГ. 25A) или один раз в неделю дозу (ФИГ. 25B) изотипа DF-mIL-12-Fc si или mIgG2A в молярном эквиваленте 1 мкг rmIL-12.

[00107] ФИГ. 26A-26B представляют собой графики, показывающие кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26, и которым еженедельно вводили дозу DF-mIL-12-Fc si подкожно. **ФИГ. 26A** представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и обработанных один раз (еженедельно) либо 2 мкг контрольного изотипа mIgG2a, либо 1 мкг DF-mIL-12-Fc si. **ФИГ. 26B** представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и обработанных один раз (еженедельно) либо 2 мкг контрольного изотипа mIgG2a, либо 2 мкг DF-mIL-12-Fc si.

[00108] ФИГ. 27A-27C представляют собой графики, показывающие уровни IFN-γ (ФИГ. 27A), CXCL9 (ФИГ. 27B) и CXCL10 (ФИГ. 27C) в образцах крови (слева) и опухоли (справа) через 72 часа после однократной дозы DF-mIL-12-Fc si у мышей C57BL/6 с опухолями B16F10.

[00109] ФИГ. 28A-28C представляют собой линейные графики, показывающие фармакокинетику DF-hIL-12-Fc si у яванских макак, получавших однократную подкожную дозу 1 мкг/кг (ФИГ. 28A), 2 мкг/кг (ФИГ. 28B) или 4 мкг/кг (ФИГ. 28C) DF-hIL-12-Fc si. 2240, 2241, 2740, 2741 обозначают отдельных субъектов-яванских макак.

[00110] ФИГ. 29A-29F представляют собой линейные графики, показывающие концентрации IFN-γ и IP10/CXCL10 у яванских макак, получивших однократную подкожную дозу DF-of hIL-12-Fc si. На ФИГ. 29A, 29C и 29E показаны концентрации/уровни экспрессии IFN-γ у яванских макак, обработанных 1 мкг/кг, 2 мкг/кг и 4 мкг/кг DF-hIL-12-Fc si, соответственно. На ФИГ. 29B, 29D и 29F показаны концентрации/уровни экспрессии IP10/CXCL10 у яванских макак, обработанных 1 мкг/кг, 2 мкг/кг и 4 мкг/кг DF-hlL-12-Fc si, соответственно. 3240, 3241, 3740, 3741 обозначают отдельных субъектов-яванских макак.

[00111] ФИГ. 30 представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных клетками рака груди, и которым еженедельно вводили дозу монотерапии (изотипический контроль, DF-mIL-12-Fc si, Doxil® (химиотерапия) или облученных 10 Гр) или комбинированную терапию (DF-mIL-12-Fc si в сочетании с Doxil® или лучевой терапией).

[00112] ФИГ. 31A представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и обработанных (один раз в две недели) либо изотипическим контролем, либо анти-PD-1 антителом. **ФИГ. 31B** представляет собой график, показывающий кривую роста опухоли мышей Balb/c, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и обработанных (один раз в две недели) либо изотипическим контролем, либо антителом против PD-1. На ФИГ. 31B также показаны кривые роста опухоли у отдельных мышей, ранее получавших антитело против PD-1, которым вводили антитело против PD-1 (один раз в две недели) вместе с еженедельной обработкой 1 мкг DF-mIL-12-Fc si.

[00113] ФИГ. 32A представляет собой график, показывающий кривые роста опухолей обработанных (treated (Tr)) опухолей у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и внутриопухолево обработанных один раз (еженедельно) либо изотипическим контролем, либо DF-mIL-12-Fc si. **ФИГ. 32B** представляет собой график,

показывающий кривые роста опухолей необработанных (non-treated (NT)) опухолей CT26-Tyrp1 у отдельных мышей, описанных на ФИГ. 32 A.

[00114] ФИГ. 33A представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и обработанных один раз либо 2 мкг контрольного изотипа mIgG2a, либо 2 мкг DF-mIL-12-Fc si. **ФИГ. 33B** представляет собой график, показывающий средние кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и обработанных 2 мкг контрольного изотипа mIgG2a, 1 мкг DF-mIL-12-Fc si (еженедельное введение), 2 мкг DF-mIL-12-Fc si (еженедельное введение) или 2 мкг DF-mIL-12-Fc si (однократно)

[00115] ФИГ. 34A представляет собой график, показывающий продукцию IFN-γ PHA-стимулированными PBMC, обработанными DF hIL-12-Fc-si, имеющего мутации L234A, L235A и P329A (LALAPA) или мутации L234A, L235A, P329G (LALAPG). На **ФИГ. 34B** показаны гистограммы проточной цитометрии связывания конъюгированного с флуорофором hIgG1 с клетками THP-1 в присутствии или в отсутствие DF hIL-12-Fc-si, имеющего мутации LALAPA или мутации LALAPG.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0116] Изобретение обеспечивает усовершенствования гетеродимерных Fc-слитых белков, фармацевтических композиций, содержащих такие белки, и терапевтических способов с применением таких белков и фармацевтических композиций, в том числе, для лечения рака.

[0117] Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, ряд терминов и фраз определен ниже.

[0118] Используемые в данном документе термины «a» и «an» означают «один или несколько» и включают множественное число, если контекст не является неподходящим.

[0119] Используемые в данном документе термины «субъект» и «пациент» относятся к организму, подлежащему лечению описанными в данном документе способами и композициями. Такие организмы желательно включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих (например, мышей, обезьян, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, собак, кошачьих и т.п.) и более предпочтительно включают людей.

[0120] Используемый в данном документе термин «эффективное количество» относится к количеству соединения (например, соединения по настоящему изобретению), достаточному для достижения положительных или желаемых результатов (например, желаемого профилактического или терапевтического эффекта). Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений, приложений или дозировок, и оно не предназначено для ограничения конкретным составом или путем введения. Используемый в данном документе термин «лечение» включает любой эффект, например уменьшение, ослабление, модуляцию, улучшение или устранение, который приводит к улучшению состояния, заболевания, расстройства и т.п. или облегчению их симптомов.

[0121] Используемый в данном документе термин «фармацевтическая композиция» относится к комбинации активного средства с носителем, инертным или активным, что делает композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического применения *in vivo* или *ex vivo*.

[0122] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, такому как фосфатно-солевой буферный раствор, вода, эмульсии (например, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло), и различные типы смачивающих веществ. Композиции также могут включать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов см., например, в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Puhl. Co., Easton, PA [1975].

[0123] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к любой фармацевтически приемлемой соли (например, кислота или основание) соединения по настоящему изобретению, которая при введении субъекту способна обеспечить соединение по данному изобретению или его активный метаболит, или его остаток. Как известно специалистам в данной области техники, «соли» соединений по настоящему изобретению могут быть производными неорганических или органических кислот и оснований. Примеры кислот включают, но не ограничиваются ими, соляную, бромистоводородную, серную, азотную, хлорную, фумаровую, малеиновую, фосфорную, гликолевую, молочную, салициловую, янтарную, толуол-пара-сульфоновую, винную, уксусную, лимонную, метансульфоновую, этансульфоновую, муравьиную, бензойную, малоновую, нафталин-2-сульфоновую, бензолсульфоновую кислоту и тому подобное.

Другие кислоты, такие как щавелевая, хотя сами по себе не являются фармацевтически приемлемыми, могут быть использованы при получении солей, используемых в качестве промежуточных продуктов при получении соединений по изобретению и их фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей.

[0124] Примеры оснований включают, но не ограничиваются ими, гидроксиды щелочных металлов (например, натрия), гидроксиды щелочноземельных металлов (например, магния), аммиак и соединения формулы NWf, где W представляет собой C1-4-алкил, и тому подобное.

[0125] Примеры солей включают, но не ограничиваются ими: ацетат, адипат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанепропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, флукогептаноат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, оксидолинсульфонат, 2-гидроксиэтансульфонат, лактотансульфонат, 2-гидроксиэтансульфонат, лактотансульфонат, 2-оксиэтансульфонат, лактотансульфонат, лактотансульфонат персульфат, фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, тозилат, ундеканоат и т.п. Другие примеры солей включают анионы соединений по настоящему изобретению, соединенные с подходящим катионом, таким как Na^+, NHV и NWf (где W представляет собой C1-4 алкильную группу) и тому подобное.

[0126] Для терапевтического применения соли соединений по настоящему изобретению рассматриваются как фармацевтически приемлемые. Однако соли кислот и оснований, которые не являются фармацевтически приемлемыми, также могут найти применение, например, при получении или очистке фармацевтически приемлемого соединения.

[0127] На протяжении всего описания, где описываются композиции как имеющие, включающие или содержащие определенные компоненты, или где процессы и способы описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные стадии, предполагается, что, кроме того, существуют композиции по настоящему изобретению, которые по существу состоят из перечисленных компонентов или состоят из них, и что существуют процессы и способы в соответствии с настоящим изобретением, которые по существу состоят из перечисленных стадий обработки или состоят из них.

[0128] Как правило, композиции с указанием процентного содержания являются массовыми, если не указано иное. Кроме того, если переменная не сопровождается определением, то используется предыдущее определение переменной.

I. Белки

[0129] Настоящее изобретение относится к конструкциям Fc-слитых белков, содержащим аминокислотные последовательности мультисубъединичного белка. Данные конструкции слитых белков могут демонстрировать более высокий период полужизни в сыворотке по сравнению с нативным/природным мультисубъединичным белком, улучшенный выход во время продуцирования, повышенную стабильность во время хранения и/или повышенную эффективность при применении в качестве лекарственного препарата.

IgG1 Fc-слитые белки

[0130] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает гетеродимерный IgG1 Fc-слитый белок, содержащий: первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела IgG1, и второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела IgG1, связанный с первым полипептидом Fc-домена антитела, где первый полипептид дополнительно содержит первую субъединицу многосубъединичного белка, слитую линкером, содержащим аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 237) или EPKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 6), с первым полипептидом Fc-домена антитела, в которой X_1 представляет L или A, X_2 представляет L, E или A, и X_3 представляет A или G; вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела, и субъединицы мультисубъединичного белка связаны друг с другом; когда X_1 представляет L и/или X_2 представляет L, по меньшей мере один из первого полипептида Fc-домена антитела и второго полипептида Fc-домена антитела содержит мутацию Q347R, способствующую гетеродимеризации.

[0131] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности PKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 237) или

EPKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO:6), в которой X_1 представляет L или A, X_2 представляет L, E или A и X_3 представляет A или G.

[0132] В некоторых вариантах осуществления линкер, соединяющий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, дополнительно содержит спейсерный пептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 237 или SEQ ID NO: 6 и спейсерный пептид.

[0133] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела с помощью линкера, который содержит последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 237) или

EPKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 6), в которой X_1 представляет L или A, X_2 представляет L, E или A, и X_3 представляет A или G, и спейсерный пептид. В определенных вариантах осуществления изобретения вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела с помощью линкера, который состоит из аминокислотной последовательности PKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 237) или EPKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 6), в которой X_1 представляет L или A, X_2 представляет L, E или A, и X_3 представляет A или G. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность линкера, соединяющего вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка со вторым полипептидом Fc-домена антитела, идентична аминокислотной последовательности линкера, соединяющего субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела.

[0134] Можно использовать любой спейсерный пептид, описанный под заголовком «Спейсерные пептиды». Например, в некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 107-120. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в любой из SEQ ID NO: 107-120. В некоторых вариантах осуществления линкер, соединяющий субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из описанного в данном документе спейсерного пептида и пептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 237 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах

осуществления линкер, соединяющий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка со вторым полипептидом Fc-домена антитела, состоит или по существу состоит из спейсерного пептида, описанного в данном документе, и пептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 237 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид является N-концевым по отношению к одному или обоим линкерам.

[0135] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, содержит аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239) или EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239) или

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 9).

[0136] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, содержит аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239). В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239).

[0137] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 10) или

GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 244). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка

слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 10) или

GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 244).

[0138] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 10).

[0139] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, содержит аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 238) или EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, сливающий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности

PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 238) или EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 7).

[0140] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 8) или

GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 241). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка

слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 8) или

GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 241).

[0141] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 15) или

GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 242). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 15) или

GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 242).

[0142] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 16) или

GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 243). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 16) или

GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCP APELLGG (SEQ ID NO: 243).

[0143] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым

полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 65) или

GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 245). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 65) или

GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 245).

[0144] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 66) или

GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 246). В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 66) или

GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 246).

[0145] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, содержит аминокислотную последовательность EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 11) или PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 240). В некоторых вариантах осуществления внутри гетеродимерного Fc-слитого белка линкер, сливающий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 11) или

PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 240).

[0146] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 12) или

GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 247). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 12) или

GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 247).

[0147] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 67) или

GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 248). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 67) или

GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 248).

[0148] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 68) или

GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 249). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со

вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 68) или

GGGGS GGGGSPKS SDKTHT CPP CP APE AEGA (SEQ ID NO: 249).

[0149] В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc-домена представляет собой полипептид Fc IgG1. В некоторых вариантах осуществления белок по настоящему изобретению включает первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела, которые оба являются мутированными полипептидами Fc-домена IgG1, что способствует их гетеродимеризации друг с другом. Например, если Fc-домен происходит от Fc человеческого IgG1, Fc-домен может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 человеческого антитела IgG1, и отличаться в одном или нескольких положении(ях), выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439.

[0150] В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 человеческого антитела IgG1, и отличаться одной или несколькими заменами, выбранными из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W3, S64364, S64364, S64364, S64364, S64364, S64364, S64364 T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, S400K40, D399K40, D399K40, D399K40, D399KR F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E. Все положения аминокислот в Fc-домене или шарнирной области, описанных в данном документе, пронумерованы в соответствии с нумерацией EC.

[0151] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG1 включает одну или несколько мутаций, выбранных из K360E и K409W, и второй полипептид Fc-домена антитела IgG1 включает одну или несколько мутаций, выбранных из Q347R, D399V, и F405T. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG1 включает одну или несколько мутаций, выбранных из Q347R, D399V

и F405T, и второй полипептид Fc-домена антитела IgG1 включает одну или несколько мутаций, выбранных из K360E и K409W. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена IgG1 антитела включает мутации K360E и K409W, и второй полипептид Fc-домена IgG1 антитела включает мутации Q347R, D399V и F405T. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена IgG1 антитела включает мутации Q347R, D399V и F405T, и второй полипептид Fc-домена IgG1 антитела включает мутации K360E и K409W.

[0152] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению с Fc IgG1 включает одну или несколько мутаций для снижения связывания с FcγR (например, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA или FcγRIIIB) или компонентом комплемента (например, Clq) в первом и/или втором полипептидах. Такие мутации полезны для снижения эффекторных функций. Например, белок по настоящему изобретению включает мутации LALA (L234A и L235A), мутации LALAPA (L234A, L235A и P329A), мутации LALAPG (L234A, L235A и P329G) или мутации LALEGAASPS (L234A, L235E, G237A, A330S и P331S).

[0153] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок согласно изобретению включает первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 или IgG1 и второй полипептид Fc-домена антитела IgG4 или IgG1, каждый из которых содержит мутацию P329G или P329A. В конкретных вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению включает первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 или IgG1 и второй полипептид Fc-домена антитела IgG4 или IgG1, каждый из которых содержит мутацию P329A.

[0154] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG1 и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG1, каждый, содержат мутацию, выбранную из A330S и P331S. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG1 и второй, отличающийся полипептид Fc-домена антитела IgG1 содержат мутации A330S и P331S.

[0155] В некоторых вариантах осуществления вводится дополнительная дисульфидная связь между мономерами Fc IgG1, которая улучшает стабильность гетеродимера. В типичном варианте осуществления первый полипептид Fc-домена антитела, слитый с первой субъединицей мультисубъединичного белка, включает замену Y349C в домене CH3,

которая образует дисульфидную связь с заменой S354C на полипептиде Fc-домена второго антитела, слитом со второй, отличающейся субъединицей мультисубъединичного белка. В качестве альтернативы, первый полипептид Fc-домена антитела, слитый с первой субъединицей мультисубъединичного белка, включает замену S354C в домене CH3, которая образует дисульфидную связь с заменой Y349C на полипептиде Fc-домена второго антитела, слитом со второй, отличающейся субъединицей мультисубъединичного белка.

[0156] Любой из полипептидов Fc-домена антитела IgG1, представленных в таблице 2 ниже, можно использовать в комбинации с любой из шарнирных последовательностей IgG1 (которые в настоящем изобретении являются частью линкера или целым линкером, соединяющим белковую последовательность первой субъединицы мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела IgG1 или линкером, соединяющим дополнительную субъединицу со вторым, отличающимся полипептидом Fc-домена антитела IgG1), представленных в таблице 1 ниже. Типичные полипептиды шарнирного Fc-домена IgG1 представлены в таблице 3 ниже. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-слитого белка содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 212 и 212; 213 и 214; 215 и 216; 217 и 218; 214 и 213; 216 и 215; или 218 и 217, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-слитого белка содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 228 и 228; 229 и 230; 231 и 232; 233 и 234; 235 и 236; 230 и 229; 232 и 231; 234 и 233; 236 и 235; 228 и 250; 250 и 228; 250 и 250; 229 и 252; 252 и 229; 251 и 230; 230 и 251; 253 и 232; 232 и 253; 231 и 254; 254 и 231; 255 и 234; 234 и 255; 233 и 256; 256 и 233; 257 и 236; 236 и 257; 258 и 235; или 235 и 258, соответственно.

IgG4 Fc-слитые белки

[0157] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает улучшение мультисубъединичного белка. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает гетеродимерный слитый с IgG4 Fc белок, содержащий: первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела IgG4, и второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена другого антитела IgG4, связанный с первым полипептидом Fc-домена антитела, где первый полипептид дополнительно содержит первую субъединицу мультисубъединичного белка, слитую линкером, содержащим аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG (SEQ ID NO: 1), с первым

полипептидом Fc-домена антитела IgG4, в которой X представляет L или E; вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc домена IgG4 антитела, и субъединицы мультисубъединичного белка связаны друг с другом; первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела IgG4 содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации.

[0158] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного слитого с IgG4 Fc белка, линкер, соединяющий первую субъединицу многосубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG, в которой X представляет L или E (SEQ ID NO: 1).

[0159] В некоторых вариантах осуществления линкер, соединяющий белковую последовательность первой субъединицы мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, дополнительно содержит спейсерный пептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 1 и спейсерный пептид.

[0160] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела с помощью линкера, который содержит последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG, в которой X представляет L или E (SEQ ID NO: 1), и спейсерный пептид. В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела с помощью линкера, который состоит из аминокислотной последовательности RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG, в которой X представляет L или E (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность линкера, соединяющего вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка со вторым полипептидом Fc-домена антитела, идентична аминокислотной последовательности линкера, соединяющего субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела.

[0161] Можно использовать любой спейсерный пептид, описанный под заголовком «Спейсерные пептиды». Например, в некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 107-120. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 107-120. В

некоторых вариантах осуществления линкер, соединяющий субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из или по существу состоит из описанного в данном документе спейсерного пептида и SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из описанного в данном документе спейсерного пептида и SEQ ID NO: 1 или по существу состоит из него. В некоторых вариантах осуществления спейсерный пептид находится на N-конце первого линкера и/или второго линкера.

[0162] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, содержит аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления линкер, сливающий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности

RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 2).

[0163] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3).

[0164] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 13).

[0165] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGS GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 14).

[0166] В некоторых вариантах осуществления, внутри гетеродимерного Fc-слитого белка, линкер, соединяющий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, содержит аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления линкер, сливающий первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, состоит из аминокислотной последовательности

RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 4).

[0167] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 5).

[0168] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 63). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 63).

[0169] В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 64). В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 64).

[0170] В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc-домена представляет собой полипептид Fc IgG4. IgG4 представляет собой нестабильный димер, который может подвергаться обмену Fab-плеча и образовывать пару с другими антителами IgG4 в организме. В некоторых вариантах осуществления мутация S228P вводится в шарнир (который в настоящем изобретении является частью линкера или целым линкером, соединяющим первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела IgG4, или линкером, соединяющим дополнительную субъединицу со вторым, отличающимся полипептидом Fc-домена антитела IgG4), что увеличивает стабильность шарнирной области и снижает вероятность обмена Fab-плеча. В некоторых вариантах осуществления вводится дополнительная дисульфидная связь между мономерами полипептида Fc-домена, которая улучшает стабильность гетеродимера. В типичном варианте осуществления первый полипептид Fc-домена антитела, связанный с первой субъединицей мультисубъединичного белка, включает замену Y349C в домене CH3, которая образует дисульфидную связь с заменой S354C на полипептиде Fc-домена второго антитела, связанном со второй, отличающейся субъединицей мультисубъединичного второго полипептида Fc-домена антитела.

В качестве альтернативы, первый полипептид Fc-домена антитела, связанный с первой субъединицей мультисубъединичного белка, включает замену S354C в домене CH3, которая образует дисульфидную связь с заменой Y349C на полипептиде Fc-домена второго антитела, связанном со второй, отличающейся субъединицей мультисубъединичного белка.

[0171] В некоторых вариантах осуществления белок по настоящему изобретению включает первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела, которые

оба являются мутированными полипептидами Fc-домена IgG4, что способствует их гетеродимеризации друг с другом.

[0172] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает одну или несколько мутаций, выбранных из K360E, K370E и R409W, и второй полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает одну или несколько мутаций, выбранных из E357N, Q347R, D399V и F405T. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает мутации K370E и R409W, и второй полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает мутации E357N, D399V и F405T. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает мутации E357N, D399V и F405T, и второй полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает мутации K370E и R409W. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает мутации K360E и R409W, и второй полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает мутации Q347R, D399V и F405T. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает мутации Q347R, D399V и F405T, и второй полипептид Fc-домена антитела IgG4 включает мутации K360E и R409W.

[0173] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению с Fc IgG4 включает одну или несколько мутаций для уменьшения связывания с FcγR (например, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA или FcγRIIIB) или компонентом комплемента (например, Clq) в первом и/или втором полипептиде(ах). Такие мутации применимы для снижения эффекторных функций. Например, белок по настоящему изобретению включает мутации SPLE (S228P и L235E), мутации SPLEPA (S228P, L235E и P329A) или мутации SPLEPG (S228P, L235E и P329G).

[0174] Любой из полипептидов Fc-домена антитела IgG4, представленных в таблице 2, может использоваться в комбинации с любой из шарнирных последовательностей IgG4 (которая в настоящем изобретении является частью линкера или целым линкером, соединяющим первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела IgG4, или линкером, соединяющим вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка со вторым, отличающимся полипептидом Fc-домена антитела IgG4), представленных в таблице 1. Типичные полипептиды шарнирного Fc-домена IgG4 представлены в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-слитого белка содержат аминокислотные последовательности

SEQ ID NO: 205 и 205; 206 и 207; 208 и 209; 210 и 211; 207 и 206; 209 и 208; или 211 и 210, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-слитого белка содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 219 и 219; 220 и 221; 222 и 223; 224 и 225; 226 и 227; 221 и 220; 223 и 222; 225 и 224; или 227 и 226, соответственно.

Дисульфидные связи

[0175] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению включают нативную гетеродимерную дисульфидную связь между первой субъединицей мультисубъединичного белка и второй, отличающейся субъединицей мультисубъединичного белка. Например, в типичном варианте осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок согласно изобретению включает нативную гетеродимерную дисульфидную связь между субъединицами p35 и p40 IL-12. Такой белок включает нативную дисульфидную связь между C74 p35 и C177 p40.

[0176] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению включают искусственную или сконструированную гетеродимерную дисульфидную связь между первой субъединицей мультисубъединичного белка и второй, отличающейся субъединицей мультисубъединичного белка. Например, в типичном варианте осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок согласно изобретению включает искусственную или сконструированную гетеродимерную дисульфидную связь между субъединицами p35 и p40 IL-12. Такой белок включает искусственную или сконструированную дисульфидную связь между V185C p35 и Y292C p40.

[0177] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению включают нативную гетеродимерную дисульфидную связь между первой субъединицей мультисубъединичного белка и второй, отличающейся субъединицей мультисубъединичного белка, и искусственную или сконструированную гетеродимерную дисульфидную связь между первой субъединицей мультисубъединичного белка и второй, отличающейся субъединицей мультисубъединичного белка. Например, в типичном варианте осуществления нативная гетеродимерная дисульфидная связь имеется между субъединицами p35 и p40 IL-12 и включает искусственную или сконструированную гетеродимерную дисульфидную связь между субъединицами p35 и p40 IL-12. Такой белок

включает нативную дисульфидную связь между C74 p35 и C177 p40 и искусственную или сконструированную дисульфидную связь между VI 85C p35 и Y292C p40.

[0178] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению сконструированы так, чтобы удалить нативную дисульфидную связь и заменить ее ненативной искусственной или сконструированной дисульфидной связью. Например, в типичном варианте осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по изобретению включает p35 IL-12, в которой нативный C74 мутирован в серин, и p40 IL-12, в которой нативный C177 мутирован в серин, тем самым удаляя нативную дисульфидную связь между субъединицами p35 и p40 IL-12. В такой мутированный IL-12 вводятся две новые мутации, V185C на p35 и Y292C на p40, тем самым вводя ненативную искусственную или сконструированную дисульфидную связь.

Последовательности компонентов Fc-слитых полипептидов

[0179] Типичные гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению сконструированы с любой из последовательностей вариантов Fc IgG1 или IgG4 и любой из соответствующих линкерных последовательностей, описанных в таблицах 1-2 ниже. Конструкции слитых белков по настоящему изобретению могут обеспечивать более высокий период полужизни в сыворотке по сравнению с нативным/природным мультисубъединичным белком, улучшать выход белков во время продуцирования, повышать стабильность во время хранения и/или улучшать эффективность при применении в качестве лекарственного препарата.

[0180] В таблицах 4 и 5 перечислены аминокислотные последовательности иллюстративных белковых конструкций по настоящему изобретению. Все мутации/замены в полипептидах Fc-домена пронумерованы в соответствии с системой нумерации EC. Мутации в субъединицах p35 и p40 пронумерованы, начиная с соответствующих N-концевых аминокислот данных субъединиц.

[0181] Любой из полипептидов варианта Fc-домена антитела IgG4, представленных в таблице 2 ниже, можно использовать в комбинации с любой из шарнирных последовательностей IgG4, представленных в таблице 1 ниже. Аналогично, любой из полипептидов варианта Fc-домена антитела IgG1, представленных в таблице 2 ниже, можно использовать в комбинации с любой из шарнирных последовательностей IgG1,

представленных в таблице 1 ниже. Типичные полипептиды шарнирного Fc-домена IgG1 представлены в таблице 3 ниже.

Таблица 1: Варианты линкеров

Шарнир	**Аминокислотная последовательность**
Консенсусная последовательность шарнира IgG4	RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG где X представляет собой L или E (SEQ ID NO: 1)
Шарнир IgG4 S228P	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGG (SEQ ID NO: 2)
Шарнир IgG4 S228P/L235E	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFEGG (SEQ ID NO: 4)
Консенсусная последовательность шарнира IgG1	EPKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ где X_1 представляет собой L или A; X_2 представляет собой L, E или A; и X_3 представляет собой A или G (SEQ ID NO: 6)
Шарнир IgG1 C220S	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 7)

Шарнир	**Аминокислотная последовательность**
Шарнир IgG1 C220S/L234A/L235A	EPKSSDKTHTCPPCPAPE**AA**GG (SEQ ID NO: 9)
Шарнир IgG1 C220S/L234A/L235E/ G237A	EPKSSDKTHTCPPCPAPE**AEGA** (SEQ ID NO: 11)
IgG1 шарнир ΔE216	PKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ где X_1 представляет собой L или A; X_2 представляет собой L, E или A; и X_3 представляет собой A или G (SEQ ID NO: 237)
Шарнир IgG1 E216/C220S	PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 238)
Шарнир IgG1 E216/C220S/L234A/ L235A	PKSSDKTHTCPPCPAPE**AA**GG (SEQ ID NO: 239)

Шарнир IgG1 E216/C220S/L234A/ L235E/G237A	PKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AE**G**A** (SEQ ID NO: 240)

Таблица 2: Последовательности IgG4 Fc и IgG1 Fc дикого типа; и типичные последовательности варианта Fc антитела IgG4 и варианта Fc антитела IgG1 (аминокислотные замены выделены жирным шрифтом)

Fc-домен	**Аминокислотная последовательность***
IgG4 Fc дикого типа	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:205)
IgG4 Fc Y349C/ K370E/ R409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSQEEMTKNQVSLTCV **E**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:206)
IgG4 Fc S354C/ E357N/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**QE**N**MTKNQVSLTCLVKG FYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:207)

Fc-домен	**Аминокислотная последовательность***
IgG4 Fc Y349C/ K360E/ R409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSQEEMT**E**NQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:208)
IgG4 Fc Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**QEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:209)

IgG4 Fc P329A/ Y349C/ K360E/ R409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGL**A**SSIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSQEEMT**E**NQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:210)
IgG4 Fc P329A/ S354C/ Q347R/ D399V/F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGL**A**SSIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**QEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:211)
IgG1 Fc дикого типа	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:212)
IgG1 Fc Y349C/ K360E/ K409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:213)
IgG1 Fc Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:214)

Fc-домен	**Аминокислотная последовательность***
IgG1 Fc P329A/ Y349C/ K360E/ K409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:215)
IgG1 Fc P329A/ Q347R/ S354C/ D399V/F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:216)
IgG1 Fc A330S/ P331 S/ Y349C/	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV

K360E/ K409W	SNKALP**SS**IEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:217)
IgG1 Fc A330S/ P331S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALP**SS**IEKTISKAKG**Q**PREP**R**VYTLPP**C**RDELTKN**Q**VSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:218)

* Аминокислотные последовательности могут дополнительно содержать лизин (K) на C-конце.

Таблица 3: S228P-мутированный IgG4 шарнир-Fc (дикого типа); Типичные варианты S228P-мутированного IgG4 шарнира-Fc или варианты шарнирной части-Fc; C220S-мутированный IgG1 шарнира-Fc (дикого типа); Типичные варианты C220S-мутированного IgG1 шарнир-Fc или варианты шарнирной части-Fc

Линкер-Fc	**Аминокислотная последовательность***
IgG4 шарнир-Fc S228P	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:219)
IgG4 шарнир-Fc S228P/ Y349C/ K370E/ R409W	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV **C**TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV**E**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:220)

Линкер-Fc	**Аминокислотная последовательность***
IgG4 шарнир-Fc S228P/S354C / E357N/D399V/ F405T	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPP**C**QE**N**MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 221)
IgG4 шарнир-Fc	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV

S228P/Y349C / K360E/R409W	VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV **C**TLPPSQEEMT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 222)
IgG4 шарнир-Fc S228P/Q347R / S354C/D399V/ F405T	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**V YTLPP**C**QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 223)
IgG4 шарнир-Fc S228P/L235E / Y349C/K360E / R409W	RVESKYGPPCP**P**CPAP**E**FCGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV **C**TLPPSQEEMT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 224)
IgG4 шарнир-Fc S228P/L235E / S354C/Q347R / D399V/F405T	RVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**V YTLPP**C**QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 225)
IgG4 шарнир-Fc S228P/L235E / P329A/Y349C / K360E/R409W	RVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL**A**SSIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSQEEMT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 226)
IgG4 шарнир-Fc S228P/L235E / P329A/S354C / Q347R/D399V /	RVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL**A**SSIEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPPCQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENN

F405T	YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 227)

Линкер-Fc	**Аминокислотная последовательность***
IgG1 шарнир-Fc C220S	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 228)
IgG1 шарнир-Fc ΔE216/ C220S	PKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 250)
IgG1 шарнир-Fc C220S/ Y349C/ K360E/ K409W	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ V**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 229)
IgG1 шарнир-Fc ΔE216/ C220S/ Y349C/ K360E/ K409W	PKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 251)
IgG1 шарнир-Fc C220S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY

	KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 230)
IgG1 шарнир-Fc ΔE216/ C220S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 252)
IgG1 шарнир-Fc C220S/ L234A/ L235A/ Y349C/ K360E/ K409W	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ V**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 231)

Линкер-Fc	**Аминокислотная последовательность***
Шарнир IgG1-Fc ΔE216/ C220S/ L234A/ L235A/ Y349C/ K360E/ K409W	PKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ V**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:253)
Шарнир IgG1-Fc C220S/ L234A/ L235A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:232)

Шарнир IgG1-Fc ΔE216/ C220S/ L234A/ L235A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPR VYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:254)
Шарнир IgG1-Fc C220S/ L234A/ L235A/ P329A/ Y349C/ K360E/ K409W	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:233)
Шарнир IgG1-Fc ΔE216/ C220S/ L234A/ L235A/ P329A/ Y349C/ K360E/ K409W	PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREP QV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:255)
Шарнир IgG1 -Fc C220S/ L234A/ L235A/ P329A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREP **R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:234)
Шарнир IgG1-Fc ΔE216/ C220S/ L234A/ L235A/ P329A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREP **R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:256)

Линкер-Fc	**Аминокислотная последовательность***
IgG1 шарнир-Fc	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AE**G**A**PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC

C220S/ L234A/ L235E/ G237A/ A330S/ P331S/ Y349C/ K360E/ K409W	VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**SS**IEKTISKAKGQPREPQ V**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 235)
IgG1 шарнир-Fc ΔE216/ C220S/ L234A/ L235E/ G237A/ A330S/ P33l S/ Y349C/ K360E/ K409W	PKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AE**G**A**PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**SS**IEKTISKAKGQPREPQV **C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 257)
IgG1 шарнир-Fc C220S/ L234A/ L235E/ G237A/ A330S/ P33l S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AE**G**A**PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**SS**IEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 236)
IgG1 шарнир-Fc ΔE216/ C220S/ L234A/ L235E/ G237A/ A330S/ P331S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AE**G**A**PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**SS**IEKTISKAKGQPREP**R**V YTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 258)

*Аминокислотные последовательности могут дополнительно содержать лизин (K) на C-конце.

Таблица 4: Типичные гетеродимерные Fc-слитые полипептидные конструкции

Последователь-ность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
Конструкция 101		
RVESKYGPP	(SEQ ID NO: 129)	IgG4 (IL-12 p40)

CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV	Гетеродимеризацион-ные мутации: K370E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и

Последователь-ность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	улучшения термостабильности: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 130) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC QENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризацион-ные мутации: E357N/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 102		

RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 131) IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризацион-ные мутации: K360E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 132) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 103		

RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 133) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P и L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP	(SEQ ID NO: 134) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV	IgG4 (IL-12 p35)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P и L235E

Конструкция 104		
RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO:135) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P, L235E, P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 136) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDMQNMLAV	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P, L235E, P329A

Конструкция 106		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO: 7) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (SEQ ID NO: 238)	(SEQ ID NO: 137) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ (SEQ ID NO: 259) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последователь-ность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS PKSS DKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 138) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GS EPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 107		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 239)	(SEQ ID NO: 139) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	IgG1FcSilent (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C

	KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST	Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A

Последователь-ность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ (SEQ ID NO: 260) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS PKSS DKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 140) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDMQNMLAV	IgG1FcSilent (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T

	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
		C220 в верхнем шарнире мутирован в S
	Конструкция 108	
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 239)	(SEQ ID NO: 141) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL TENQVSLTCL V KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ (SEQ ID NO: 261) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW	IgG1FcSilent (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329A C220 в верхнем шарнире мутирован в S

	STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS PKSSDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL TENQVSLTCL V KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD	

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 142) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDMQNMLAV NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1FcSilent (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 110		
EPKSSDKTH	(SEQ ID NO: 143)	IgG1 Fc

TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO: 11) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPEAE GA (SEQ ID NO: 240)	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL T ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ	(IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена для стабилизации дисульфидной связи: Y349C Замены для снижения связывания FcγR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	(SEQ ID NO: 262) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS PKSS DKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL T ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	

GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 144) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 Fc (IL-12 p35) Гетеродимеризацион-ные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замены для снижения связывания FcγR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S
Конструкция 111		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL	(SEQ ID NO: 145) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF	IgG4 Fc (IL-12 p40)

Последователь-ность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
GG (SEQ ID NO: 2)	GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	Гетеродимеризацион-ные мутации: K370E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 146) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNASRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCQENMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLV SDGSFTLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG	IgG4 Fc (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: E357N/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 112		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 147) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW	IgG4 Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризацион-ные мутации: K370E/R409W

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

GGGGSRVES KYGPPCPPCP APEFLGG (SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 148) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC QENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 Fc (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: E357N/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 113		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 149) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS	IgG4Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K370E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	улучшения термостабильности: S228P
GGGGSGGG GSRVESKYG PPCPPCPAPE FLGG (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 150) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSGGGGSRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCQENMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIA VEWESNGQPEN NYKTTPPVL V SDGSFTLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG	IgG4 Fc (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: E357N/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 114		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO: 7) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (SEQ ID NO: 238)	(SEQ ID NO: 151) IWELKKDVYV VELDWYPDAGEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ	IgG1 Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C C220 в верхнем шарнире мутирован в S

	GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ	

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	(SEQ ID NO: 263) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 152) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASEPKSSDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVL TV LHQDWLNGKE YKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPRVYTL PPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p35) Гетеродимеризацион-ные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Конструкция 115		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL	(SEQ ID NO: 153) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF	IgG1 Fc (IL-12 p40)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
LGG (SEQ ID NO: 7) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (SEQ ID NO: 238)	GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ (SEQ ID NO: 264) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ	Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C C220 в верхнем шарнире мутирован в S

	GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPELLGG (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 154) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN	IgG1 Fc (IL-12 p35)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSEPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALP APIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL CAУ	Гетеродимеризация мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 116		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO: 7) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (SEQ ID NO: 238)	(SEQ ID NO: 155) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C C220 в верхнем шарнире мутирован в S

	ИЛИ (SEQ ID NO: 265) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSEPKSSDK THTCPPCPAP ELLGG (SEQ IDNO: 16)	(SEQ ID NO: 156) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNASGGG GSGGGGSEPK SSDKTHTCPPCP APELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPRV YTLPPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL VSDGSFTLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Конструкция 117		
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO: 8) ИЛИ GGGGSGGG GSGGGGSPK SSDKTHTCPP CPAPELLGG (SEQ ID NO: 241)	(SEQ ID NO: 157) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDMQNMLAV NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELTENQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT	IgG1 Fc (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	TPPVLDSDGS FFLYSWLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG ИЛИ (SEQ ID NO: 266) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GS PKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELTENQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSWLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	

EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 158) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPRVY TLPPCRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVL V SDGSFTLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 118		
GGGGSEPKS SDKTHTCPP	(SEQ ID NO: 159)	IgG1 (IL-12 p40)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
CPAPELLGG (SEQ ID NO: 15) ИЛИ GGGGSPKSS DKTHTCPPC PAPELLGG (SEQ ID NO: 242)	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSGGGG SEPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWNGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	Гетеродимеризация мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C C220 в верхнем шарнире мутирован в S

	ИЛИ (SEQ ID NO: 267) IWELKKDVYV VELDWYPDAGEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSGGGGS PKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	
GGGGSEPKS SDKTHTCPP	(SEQ ID NO: 160)	IgG1 (IL-12 p35)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
CPAPELLGG (SEQ ID NO: 15)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNAS GGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALP APIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	Гетеродимеризация мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 119		

GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPELLGG (SEQ ID NO: 15) ИЛИ GGGGSPKSS DKTHTCPPC PAPELLGG (SEQ ID NO: 242)	(SEQ ID NO: 161) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS GGGG SEPKSSDKTH TCPPCP APEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG ИЛИ (SEQ ID NO: 268) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена)

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS GGGGS PKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPELLGG (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 162) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRSS IFLETMQNMLQAVIN IDKFKRSSI RIRACTIDRV MSYLNASGGGGSEPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALP APIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена)
Конструкция 119-1		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 163) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K370E/R409W замены p40: C177S, Y292C

	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS PBЭC KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	(нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замена на предотвращение обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 164) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: E357N/D399V/F405T замены p35: C74S V185C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 119-2		

RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 165) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS PBЭC KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	улучшения термостабильности: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 166) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C Замена на предотвращение обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 119-3		

RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 167) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS PBЭC KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcyR: S228P и L235E

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 168) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcyR: S228P и L235E
Конструкция 119-4		

RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 169) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcyR: S228P, L235E, P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP	(SEQ ID NO: 170) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV	IgG4 (IL-12 p35)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcyR: S228P, L235E, P329A
Конструкция 119-5		

EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO: 7) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (SEQ ID NO: 238)	(SEQ ID NO: 171) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ (SEQ ID NO: 269) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 172) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRSS IFLETMQNMLQAVIN IDKFKRSSI RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 119-6		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9) ИЛИ	(SEQ ID NO: 173) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризация мутации: K360E/K409W замены p40: C177S, Y292C

PKSSDKTHT CPPCPAPEA	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW	(нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
AGG (SEQ ID NO: 239)	ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ (SEQ ID NO: 270) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	Замены для уменьшение связывания FcγR: L234A, L235A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG	(SEQ ID NO: 174)	IgG1 (IL-12 p35)

GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT	Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C Замены для снижения связывания FcyR: L234A, L235A

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	C220 в верхнем шарнире мутирован в S
	Конструкция 119-7	
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 239)	(SEQ ID NO: 175) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замены для снижения связывания FcyR: L234A, L235A, P329A C220 в верхнем шарнире мутирован в S

	(SEQ ID NO: 271) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ	

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 176) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRSS IFLETMQNMLQAVIN IDKFKRSSI RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замены p35: C74S, V185C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 119-8		
EPKSSDKTH	(SEQ ID NO: 177)	IgG1 (IL-12 p40)

TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO: 11) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPEAE GA (SEQ ID NO: 240)	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV STDAVHKLKYEN YTSSFFIRDI EVSRVGLKYEN YTSSFFIRDI EVSRVQLKNKSFTDRVDVSKWGLVSKWKLV KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALKVGIEKTPISSNKALP SSCTQENC VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ	Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замены для снижения связывания FcyR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	(SEQ ID NO: 272) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 178) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замены p35: C74S, V185C Замены для снижения связывания FcγR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 120		

RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 179) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTCG WLTTTT	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K370E/R409W

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 180) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: E357N/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 120-1		

RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 181) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 182) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPCQEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 120-2		

RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 183) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	Замены для снижения связывания FcγR: S228P и L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 184) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

		Замены для снижения связывания FcγR: S228P и L235E
Конструкция 120-3		
RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 185) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P, L235E, P329A

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 186) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcyR: S228P, L235E, P329A
Конструкция 120-4		

EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO: 7) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (SEQ ID NO: 238)	(SEQ ID NO: 187) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ (SEQ ID NO: 273)	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 188) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRSS IFLETMQNMLQAVIN IDKFKRSSIFCLDQNMLQAV RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 120-5		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 189) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W

ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPEA	KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA	Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
AGG (SEQ ID NO: 239)	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL TENQVSLTCL V KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGPKS ИЛИ (SEQ ID NO: 274) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC	связь между субъединицами сохраняется) Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A C220 в верхнем шарнире мутирован в S

	TLPPSRDEL TENQVSLTCL V KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 190) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRSS IFLETMQNMLQAV IDKFKRSSIFCLDQNMLQAV RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	связь между субъединицами сохраняется) Замены для снижения связывания FcyR: L234A, L235A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 120-6		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 191) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W

ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 239)	STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFL YSWLTVDKSRWQQGNVFSCS VMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ (SEQ ID NO: 275) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS	Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329A C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFL	

	YSWLTVDKSRWQQGNVFSCS VMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 192) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLETMQNMLQAVNILL IDGGLGLETMQNMLQAVNI GSEPKSSDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замены для снижения связывания FcyR: L234A, L235A, P329A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 120-7		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO: 11) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPEAE GA (SEQ ID NO: 240)	(SEQ ID NO: 193) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL TENQVSLTCL V KGFYPSDIAV	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замены для снижения связывания FcyR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ (SEQ ID NO: 276) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL TENQVSLTCL V KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 194) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE AEGAPSVFLF	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется)

	PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNVGN PSDPYTLPP CRDELTKNVGV SLKTLTKNVGN TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	Замены для снижения связывания FcyR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
		C220 в верхнем шарнире мутирован в S
	Конструкция 121	
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 239)	(SEQ ID NO: 195) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ (SEQ ID NO: 277) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замены для снижения связывания FcyR: L234A, L235A Дополнительная мутация в p40: Y292C, для введения IL-12-стабилизирующей дисульфидной связи C220 в верхнем шарнире мутирован в S

	WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN	

Последователь-ность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 196) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLETMQNMLQAVL IDFLETMQNMLQAVL GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A Дополнительная мутация в p35: V185C для введения IL-12-стабилизирующей дисульфидной связи C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 122		
EPKSSDKTH	(SEQ ID NO: 197)	IgG1 (IL-12 p40)

TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 239)	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL TENQVSLTCL V KGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLT	Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329A Дополнительная мутация Y292C для введения IL-12-стабилизирующей дисульфидной связи

Последователь-ность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	VDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG ИЛИ (SEQ ID NO: 278) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH EDPEVKFNW YVDGVEVHN AKTKPREEQ YNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL TENQVSLTCL V KGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLT	C220 в верхнем шарнире мутирован в S

	VDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 198) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLETMQNMLQAVL IDFLETMQNMLQAVL GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329A Дополнительная мутация V185C для введения IL-12-стабилизирующей дисульфидной связи

Последователь-ность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
		C220 в верхнем шарнире мутирован в S
	Конструкция 123	
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO: 11) ИЛИ PKSSDKTHT CPPCPAPEAE GA (SEQ ID NO: 240)	(SEQ ID NO: 199) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замены для снижения связывания FcγR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S

	YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL T ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQMV EWESNGQPEN ИЛИ (SEQ ID NO: 279) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL T ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN	Дополнительная мутация Y292C для введения IL-12-стабилизирующей дисульфидной связи C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 200) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLETMQNMLQAVL IDFLETMQNMLQAVL	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C

	GSEPKSSDKT HTCPPCP APE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKT SNKPALPSSIE KTISKQGN SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	Замены для снижения связывания FcyR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S Дополнительная мутация V185C для введения IL-стабилизирующей дисульфидной связи C220 в верхнем шарнире мутирован в S

*Аминокислотные последовательности могут дополнительно содержать лизин (K) на C-конце.

Таблица 5: Типичные димерные Fc-слитые белки

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
Конструкция 1		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 17) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K370E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 18) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: E357N/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 2		

RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 19) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 20) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 3		

RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 21) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P и L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV	(SEQ ID NO: 22)	IgG4 (IL-12 p35)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P и L235E
Конструкция 4		

RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 23) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcyR: S228P, L235E, P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 24) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcyR: S228P, L235E, P329A
Конструкция 5		

RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 25) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLGS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P, L235E, P329G
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 26) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**

	FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLGSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcyR: S228P, L235E, P329G
Конструкция 6		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 27) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 28) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	
Конструкция 7		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 29) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTCG WLTVIST ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1FcSilent (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замены для снижения связывания FcyR: L234A, L235A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 30) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT	IgG1FcSilent (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замены для снижения связывания FcyR: L234A, L235A

	TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 8		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA	(SEQ ID NO: 31)	IgG1FcSilent

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
AGG (SEQ ID NO: 9)	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	(IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 32) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT	IgG1FcSilent (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329A

	TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 9		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 33) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTCG WLTVIST ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA	IgG1FcSilent (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALG APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL TENQVSLTCL V KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замены для снижения связывания FcγR: L234A/L235A/P329G C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 34) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALGAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT	IgG1FcSilent (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329G

	TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 10		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO: 11)	(SEQ ID NO: 35) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPS	IgG1 Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL T ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	Замены для снижения связывания FcyR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S

GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 36) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 Fc (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замены для снижения связывания FcyR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S
Конструкция 11		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 37) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN	IgG4 Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K370E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 38) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNASRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCQENMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLV SDGSFTLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG	IgG4 Fc (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: E357N/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 12		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 39) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K370E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

GGGGSRVES KYGPPCPPCP	(SEQ ID NO: 40)	IgG4 Fc

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
APEFLGG (SEQ ID NO: 13)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC QENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	(IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: E357N/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 13		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 41) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K370E/R409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

GGGGSGGG GSRVESKYG PPCPPCPAPE FLGG (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 42) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRSS IFLETMQNMLQAVY IDKFKRSSIFCLDQNML	IgG4 Fc (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: E357N/D399V/F405T

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSGGGGSRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCQENMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIA VEWESNGQPEN NYKTTPPVL V SDGSFTLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG	Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замена на предотвращение обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 14		
EPKSSDKTH TCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 43) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
EPKSSDKTH	(SEQ ID NO: 44)	IgG1 Fc

TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO: 7)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASEPKSSDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVL TV LHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTL PPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES	(IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	NGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	
	Конструкция 15	
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 45) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTCG WLTVIST ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSEPKS	(SEQ ID NO: 46)	IgG1 Fc

SDKTHTCPP CPAPELLGG (SEQ ID NO: 15)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSEPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALP APIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	(IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	Конструкция 16	
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ **ID** NO: 7)	(SEQ **ID** NO: 47) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG	(SEQ ID NO: 48)	IgG1 Fc

GSEPKSSDK THTCPPCPAP ELLGG (SEQ IDNO: 16)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNASGGG GSGGGGSEPK SSDKTHTCPPCP APELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPRV YTLPPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL VSDGSFTLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	(IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 17		
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG	(SEQ ID NO: 49) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA	IgG1 Fc (IL-12 p35)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
G (SEQ ID NO: 8)	SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELTENQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSWLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 50) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTCG WLTVIST	IgG1 Fc (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T

	ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPRVY TLPPCRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVL B SDGSFTLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 18		
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPELLGG (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 51) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSGGGG SEPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSEPKS	(SEQ ID NO: 52)	IgG1 (IL-12 p35)

SDKTHTCPP CPAPELLGG (SEQ ID NO: 15)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLETMQNMLQAVL IDKLLMDPKRQ IFLETMQNMLQAVL HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALP APIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 19		
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPELLGG (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 53) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTCG WLTVIST ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS GGGG SEPKSSDKTH TCPPCP APEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W замены p40: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена)

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPELLGG (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 54) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGGGSEPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALP APIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена)
Конструкция 19-1		

RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 69) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS PBЭC KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K370E/R409W p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замена на предотвращение обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 70) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: E357N/D399V/F405T замены p35: C74S V185C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 19-2		

RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 71) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS PBЭC KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 72) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDMQNMLAV	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	замены p35: C74S V185C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 19-3		

RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 73) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS PBЭC KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замена на предотвращение обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P и L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 74) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYNSRLTVDK SRWQEGNVFS	улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P и L235E
Конструкция 19-4		
RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 75) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P, L235E, P329A

GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 76) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C Замена на предотвращение обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Замены для снижения связывания FcγR: S228P, L235E, P329A
	Конструкция 19-5	
RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 77) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLGS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P, L235E, P329G

GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 78) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLGSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P, L235E, P329G

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	Конструкция 19-6	
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ **ID** NO: 7)	(SEQ **ID** NO: 79) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W замены p40: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG	(SEQ ID NO: 80)	IgG1 (IL-12 p35)

GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO: 8)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDMQNMLAV NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 19-7		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 81) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	p40 замены: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG	(SEQ ID NO: 82)	IgG1 (IL-12 p35)

GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRSS IFLETMQNMLQAVI RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 19-8		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 83) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W замены p40: C177S, Y292C

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	(нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG	(SEQ ID NO: 84)	IgG1 (IL-12 p35)

GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDMQNMLAV NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замены p35: C74S, V185C Замены для снижения связывания FcyR: L234A, L235A, P329A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 19-9		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 85) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W замены p40: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замены для снижения связывания FcyR: L234A/L235A/P329G

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 86) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRSS IFLETMQNMLQAVI RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALGAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T замены p35: C74S V185C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329G C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 19-10		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO: 11)	(SEQ ID NO: 87) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEFGDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASP AA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALKVGIEKTPISSNKALP SSCTQENCVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W замены p40: C177S, Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами удалена) Замены для снижения связывания FcγR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S

	NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG GSGGGGSEP	(SEQ ID NO: 88)	IgG1 (IL-12 p35)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO: 12)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замены p35: C74S, V185C Замены для снижения связывания FcγR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 20		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 55) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K370E/R409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG	(SEQ ID NO: 56) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA	IgG4 (IL-12 p35)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
(SEQ ID NO: 3)	SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Гетеродимеризационные мутации: E357N/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 20-1		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 89) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

	NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 90) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRSS IFLETMQNMLQAVY IDKFKRSSIFCLDQNML RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPCQEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P
Конструкция 20-2		

RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 91) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P и L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 92) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P и L235E

Конструкция 20-3		
RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 93) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcyR: S228P, L235E, P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 94) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
		Замены для снижения связывания FcγR: S228P, L235E, P329A
Конструкция 20-4		
RVESKYGPP CPPCPAPEFC GG (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 95) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFCGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLGS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/R409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена для предотвращения обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcγR: S228P, L235E, P329G

GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFCGG (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 96) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLGSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замена на предотвращение обмена Fab-плеча и улучшения термостабильности: S228P Замены для снижения связывания FcyR: S228P, L235E, P329G

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	Конструкция 20-5	
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ **ID** NO: 7)	(SEQ **ID** NO: 97) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) C220 в верхнем шарнире мутирован в S

	NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 98) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRSS IFLETMQNMLQAVY IDKFKRSSIFCLDQNML RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 20-6		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 99) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
	STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 100) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 20-7		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 101) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W

	STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется)

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFL YSWLTVDKSRWQQGNVFSCS VMH EALHNHYTQK SLSLSPG	Замены для уменьшение связывания FcγR: L234A, L235A, P329A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 102) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLETMQNMLQAVNILLMDPKRQ IFLETMQNMLQAVDYLMDPKRQ IFLETMQNMLQAV GSEPKSSDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329A C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 20-8		
EPKSSDKTH	(SEQ ID NO: 103)	IgG1 (IL-12 p40)

TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9)	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALG APIEKTISKA KGQPREPQVC	Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329G C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
	TLPPSRDEL TENQVSLTCL V KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 104) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLETMQNMLQAVNILLMDPKRQ IFLETMQNMLQAVDYLMDPKRQ IFLETMQNMLQAV GSEPKSSDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALGAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329G C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 20-9		
EPKSSDKTH	(SEQ ID NO: 105)	IgG1 (IL-12 p40)

TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO: 11)	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYQNSTV DGV YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL T ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	Гетеродимеризация мутации: K360E/K409W Замена p40: Y292C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замены для снижения связывания FcyR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 106) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T p35 замена: V185C (нативная дисульфидная связь между субъединицами сохраняется) Замены для снижения связывания FcyR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 21		
EPKSSDKTH	(SEQ ID NO: 57)	IgG1 (IL-12 p40)

TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9)	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замены для снижения связывания FcyR: L234A, L235A Дополнительная мутация в p40: Y292C, для введения IL-12-стабилизирующей дисульфидной связи C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 58) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRSS IFLETMQNMLQAVYIDKFKRSSIFCLDQNML RIRACTIDRV MSYLNASGGGGSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризацион-ные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замены для снижения связывания FcyR: L234A, L235A Дополнительная мутация в p35: V185C для введения IL-12-стабилизирующей дисульфидной связи

		C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 22		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 59) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL TENQVSLTCL V KGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLT VDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замены для снижения связывания FcγR: L234A, L235A, P329A Дополнительная мутация Y292C для введения IL-12-стабилизирующей дисульфидной связи C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последовательность линкера	Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков*	Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 60) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRSS IFLETMQNMLQAVY IDKFKRSSIFCLDQNML RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замены для снижения связывания FcyR: L234A, L235A, P329A Дополнительная мутация V185C для введения IL-12-стабилизирующей дисульфидной связи C220 в верхнем шарнире мутирован в S
Конструкция 23		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO: 11)	(SEQ ID NO: 61) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVICATD KTSISATD ASVPCSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPS	IgG1 (IL-12 p40) Гетеродимеризационные мутации: K360E/K409W Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: Y349C Замены для снижения связывания FcyR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S

	VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL T ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	Дополнительная мутация Y292C для введения IL-12-стабилизирующей дисульфидной связи C220 в верхнем шарнире мутирован в S

Последователь-ность линкера	**Последовательности гетеродимерных Fc-слитых белков***	**Тип IgG (субъединица IL-12); мутации/ замены**
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID N0: 62) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLA VIDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCP APE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKT SNKPALPSSIE KTISKQGN SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) Гетеродимеризационные мутации: Q347R/D399V/F405T Замена на стабилизирующую дисульфидную связь: S354C Замены для снижения связывания FcyR и Clq: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S Дополнительная мутация V185C для введения IL-12 стабилизирующей дисульфидной связи C220 в верхнем шарнире мутирован в S

*Аминокислотные последовательности могут дополнительно содержать лизин (K) на C-конце.

Субъединицы IL-12

[0182] IL-12 представляет собой мультисубъединичный белок, включающий субъединицу p40 и субъединицу p35. Аминокислотная последовательность зрелой p40 IL-12 дикого типа представляет собой аминокислоты 23-328 с номером доступа в GenBank NP_002178.2, приведена в SEQ ID NO: 127 ниже. Аминокислотная последовательность зрелой p35 IL-12 дикого типа представляет собой аминокислоты 57-253 с номером доступа в GenBank NP_000873.2, приведена в SEQ ID NO: 128 ниже. Используемая в данном документе нумерация аминокислотных остатков p40 и p35 соответствует последовательностям зрелого белка дикого типа. В контексте настоящего описания субъединица p40 IL-12 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%), идентичную SEQ ID NO: 127. В контексте настоящего описания субъединица p35 IL-12 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичную SEQ ID NO: 128.

[0183] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов субъединицы p40 и p35 IL-12 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 121 и 122; 127 и 128; 201 и 202; 203 и 204; 123 и 124; или 125 и 126, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность субъединицы p40 IL-12 и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность субъединицы p35 IL-12. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит аминокислотную последовательность субъединицы p35 IL-12 и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность субъединицы p40 IL-12.

[0184] В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие включает гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий: первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела, и второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела, где первый полипептид дополнительно содержит первую субъединицу IL-12, слитую с первым полипептидом Fc-домена антитела линкером; и вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела, где первая и вторая различные субъединицы IL-12 связаны друг с другом, причем первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела содержит различные мутации, способствующие гетеродимеризации, при этом первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела связаны друг с другом, и где первая субъединица

IL-12 представляет собой субъединицу p40 с заменой Y292C и вторая, отличающаяся субъединица IL-12 представляет собой субъединицу p35 с заменой V185C. В некоторых вариантах осуществления первая субъединица и вторая, отличающаяся субъединица IL-12 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 125 и 126, соответственно.

[0185] Первая субъединица и вторая, отличающаяся субъединица IL-12 могут быть слиты с любым из полипептидов Fc-домена антитела через любые линкеры, описанные в настоящем документе, с образованием Fc-слитых белков, имеющих последовательности, включая, но не ограничиваясь ими, конструкции 120, 120-1, 120-2, 120-3, 120-4, 120-5, 120-6 и 120-7, как описано в таблице 4, и конструкции 20, 20-1, 20-2, 20-3, 20-4, 20-5, 20-6, 20-7, 20-8 и 20-9, как описано в таблице 5.

[0186] В некоторых вариантах осуществления субъединица p40 IL-12 дополнительно содержит замену C177 и субъединица p35 IL-12 дополнительно содержит замену C74. В некоторых вариантах осуществления C177 в субъединице p40 IL-12 заменен на S и C74 в субъединице p35 IL-12 заменен на S. В некоторых вариантах осуществления субъединицы p40 и p35 IL-12 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 123 и 124, соответственно.

[0187] Первая субъединица и вторая, отличающаяся субъединица IL-12 могут быть слиты с любым из полипептидов Fc-домена антитела через любые линкеры, описанные в настоящем документе, с образованием Fc-слитых белков, имеющих последовательности, включая, но не ограничиваясь ими, конструкции 119, 119-1, 119-2, 119-3, 119-4, 119-5, 119-6, 119-7 и 119-8, как описано в таблице 4, и конструкции 19, 19-1, 19-2, 19-3, 19-4, 19-5, 19-6, 19-7, 19-8, 19-9 и 19-10, как описано в таблице 5.

Таблица 6: Аминокислотные последовательности p40 и p35 человеческого IL-12

IL-12 p40	**IL-12 p35**
Человеческий IL-12 p40 дикого типа IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQ VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHK KEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK NYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSS DPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSV ECQEDSACP AAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNS RQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQV	Человеческий IL-12 p35 дикого типа RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSN MLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKT STVEACLPLEL TKNESCLNSRETSFITNGS CLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEF KTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDEL MQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKL CILLHAFR1RA VTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO: 128)

QGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASI SVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 127)	
Человеческий IL-12 p40 C177S Y292C IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVL TCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS (SEQ ID NO: 201)	Человеческий IL-12 p35 C74S V185C RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLA V IDELMQALNF NSETVPQKSSLEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNAS (SEQ ID NO: 202)
Человеческий IL-12 p40 Y292C IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVL TCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC	Человеческий IL-12 p35 V185C RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN

WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVECQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS (SEQ ID NO: 203)	AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNAS (SEQ ID NO: 204)
Человеческий IL-12 p40 Q56R IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVL TCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF	Человеческий IL-12 p35 E50V RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV

GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVECQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS (SEQ ID NO: 121)	EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNAS (SEQ ID NO: 122)
Человеческий IL-12 p40 Q56R C177S Y292C IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVL TCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS	Человеческий IL-12 p35 E50V C74S V185C RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLA V IDELMQALNF NSETVPQKSSLEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNAS (SEQ ID NO: 124)

(SEQ ID NO: 123)	
Человеческий IL-12 p40 Q56R Y292C IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVL TCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVECQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS (SEQ ID NO: 125)	Человеческий IL-12 p35 E50V V185C RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLEL TK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNAS (SEQ ID NO: 126)

[0188] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению включает первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 290, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 291. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению, содержащий SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 291, содержит мутацию Y349C в домене CH3 и мутацию S354C в домене CH3 второго полипептида Fc-домена антитела. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению, содержащий SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 291, содержит различные мутации в соответствующих полипептидных последовательностях Fc-домена для стимулирования гетеродимеризация между доменами Fc.

[0189] В некоторых вариантах осуществления последовательность первого полипептида включает последовательность первого полипептида Fc-домена антитела (человеческого IgG1), содержащую замены K360E и K409W. В некоторых вариантах осуществления последовательность второго полипептида содержит последовательность второго полипептида Fc-домена антитела (человеческого IgG1), содержащую замены Q347R, D399V

и F405T. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности первого и второго полипептида содержат одну или несколько мутаций для снижения эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению содержит мутации LALAPA (L234A, L235A и P329A).

[0190] В некоторых вариантах осуществления в первом полипептиде гетеродимерного Fc-слитого белка по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 290) субъединица p40 человеческого IL-12 слита с первым полипептидом Fc-домена антитела посредством первого линкера, содержащего первую аминокислотную последовательность, и во втором полипептиде гетеродимерного Fc-слитого белка по настоящему изобретению (SEQ ID NO: 291) субъединица p35 человеческого IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела посредством второго линкера, содержащего вторую аминокислотную последовательность.

[0191] SEQ ID NO: 290 представляет собой последовательность субъединицы p40 человеческого IL-12 (подчеркнутые аминокислоты), слитой с полипептидом Fc-домена человеческого IgG1. Мутации выделены жирным шрифтом.

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVL
GSGKTLTIQVKEFGDAGOYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILK
DQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG
VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAV
HKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTP
HSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY
YSSSWSEWASVPCSPKSSDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISK
AKGQPREPQV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:290)

[0192] SEQ ID NO: 291 представляет собой последовательность субъединицы p35 человеческого IL-12 (подчеркнутые аминокислотные остатки), слитой с полипептидом Fc-домена человеческого IgG1. Мутации выделены жирным шрифтом.

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID
HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFM
MALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDEL
MQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGG

GSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISK
AKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID N0: 291)

[0193] Первый и второй полипептиды, представленные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 291, соответственно, образуют дисульфидную связь из-за мутации Y349C в домене CH3 последовательности первого полипептида Fc-домена антитела (человеческий IgG1) в SEQ ID NO: 290 (выделено жирным шрифтом и подчеркнуто) и мутации S354C в домене CH3 последовательности второго полипептида Fc-домена антитела (человеческий IgG1) в SEQ ID NO: 291 (выделено жирным шрифтом и подчеркнуто), что придает стабильность гетеродимерному Fc-слитому белку (нумерация Fc в соответствии с системой EC).

[0194] Для стимулирования гетеродимеризации между двумя полипептидами Fc-домена гетеродимерного Fc-слитого белка последовательность первого полипептида Fc-домена антитела (человеческий IgG1) в SEQ ID NO: 290 включает замены K360E и K409W в домене CH3, и последовательность второго, отличающегося полипептида Fc-домена (человеческий IgG1) в SEQ ID NO: 291 включает замены Q347R, D399V и F405T в домене CH3 (нумерация Fc в соответствии с системой EC).

[0195] Последовательность первого полипептида Fc-домена антитела и последовательность второго, отличающегося полипептида Fc-домена (человеческий IgG1) в SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 291 также включают мутации L234A, L235A и P329A (LALAPA) для снижения эффекторных функций.

Спейсерные пептиды

[0196] Типичные последовательности спейсерного пептида представлены в таблице 7 и типичные полноразмерные линкерные последовательности представлены в Таблицах 4 и 5.

[0197] Внутри первого полипептида по настоящему изобретению первая субъединица мультисубъединичного белка слита через линкер с первым полипептидом Fc-домена

антитела (например, с последовательностью варианта Fc антитела IgG4 или последовательностью варианта Fc антитела IgG1, как описано в таблице 2) в направлении от амино-конца к карбоксильному концу. И во втором полипептиде по настоящему изобретению вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита через линкер со вторым полипептидом Fc-домена антитела (например, с последовательностью варианта Fc антитела IgG4 или последовательностью варианта Fc антитела IgG1, как описано в таблице 2) в направлении от амино-конца к карбоксильному концу.

[0198] В некоторых вариантах осуществления первая субъединица мультисубъединичного белка по настоящему изобретению слита через линкер с Fc-последовательностью -домена первого антитела, причем линкер содержит или состоит из спейсерного пептида L1 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 237, 238, 239 или 240. В некоторых вариантах осуществления вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела через линкер, где линкер содержит или состоит из спейсерного пептида L2 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 237, 238, 239 или 240.

[0199] В некоторых вариантах осуществления L1 и L2 представляют собой пептидные линкеры, например, L1 и/или L2 включают от 40 до 50 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления L1 состоит из от 40 до 50 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления L1 состоит из 4 до 20 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления L2 состоит из от 40 до 50 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления L2 состоит приблизительно из от 4 до 20 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления L1 и L2 каждый независимо состоят приблизительно из от 40 до 50 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления L1 и L2, каждый независимо, состоит из 4 до 20 аминокислотных остатков.

[0200] В некоторых вариантах осуществления L1 и L2 имеют оптимизированную длину и/или аминокислотный состав. В некоторых вариантах осуществления L1 и L2 имеют одинаковую длину и одинаковый аминокислотный состав. В других вариантах осуществления L1 и L2 различаются.

[0201] В некоторых вариантах осуществления L1 имеет такое же количество аминокислот, что и L2; в некоторых вариантах осуществления L1 длиннее (то есть больше по количеству

аминокислот), чем L2; в некоторых вариантах осуществления L1 короче (т.е. меньше аминокислот), чем L2.

[0202] В некоторых вариантах осуществления L1 и/или L2 являются «короткими», например, состоят из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков. Таким образом, в некоторых случаях спейсерные пептиды состоят из около 12 или менее аминокислотных остатков. В случае 0 аминокислотных остатков спейсерный пептид представляет собой пептидную связь. В некоторых вариантах осуществления L1 и/или L2 являются «длинными», например, состоят из 15, 20 или 25 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления спейсерные пептиды состоят из около от 3 до около 15, например 8, 9 или 10 смежных аминокислотных остатков. Что касается аминокислотного состава L1 и L2, пептиды выбраны со свойствами, которые придают гибкость первому и второму полипептидам белков по настоящему изобретению, не мешают связыванию первой и второй различных субъединиц друг с другом, а также сопротивляются расщеплению протеазами. Например, остатки глицина и серина обычно обеспечивают устойчивость к протеазам. Пептиды-спейсеры, подходящие для связывания первой субъединицы мультисубъединичного белка с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 237, 238, 239 или 240, и/или подходящие для связывания второй, отличающейся субъединицы мультисубъединичного белка с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 237, 238, 239 или 240 могут включать, в качестве части линкера, последовательность (GS)n, (GGS)n, (GGGS)n, (GGSG)n, (GGSGG)n и (GGGGS)n, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых вариантах осуществления L1 и/или L2 независимо включают последовательность (GGGGS)4 (SEQ ID NO: 107) или (GGGGS)3 (SEQ ID NO: 108) как часть линкера. В других вариантах осуществления L1 и/или L2 независимо включают пептидную последовательность как часть линкера, как указано в последовательностях, выбранных из: SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 120, как указано в таблице 7. В некоторых вариантах осуществления L1 и/или L2 независимо представляют собой (GGGGS)n=3 (SEQ ID NO: 108), (GGGGS)n=2 (SEQ ID NO: 109) или (GGGGS)n=1 (SEQ ID NO: 110).

Таблица 7

SEQ ID	Аминокислотная последовательность

SEQID NO: 111	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGS
SEQID NO: 112	GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS
SEQID NO: 113	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
SEQID NO: 114	GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG
SEQID NO: 115	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
SEQID NO: 116	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGS
SEQID NO: 117	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQID NO: 118	GGGGSGGGGSGGGGS
SEQID NO: 119	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQID NO: 120	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG

[0203] В некоторых вариантах осуществления L1 включает последовательность, как часть линкера, последовательность (GGGGS)n=3 (SEQ ID NO: 108) и L2 включает, как часть линкера, последовательность (GGGGS)n=2 (SEQ ID NO: 109) или (GGGGS)n=1 (SEQ ID NO: 110). В некоторых вариантах осуществления L2 включает последовательность, как часть линкера, последовательность (GGGGS)n=3 (SEQ ID NO: 108) и L1 включает, как часть линкера, последовательность (GGGGS)n=2 (SEQ ID NO: 109) или (GGGGS)n=1 (SEQ ID NO: 110). В некоторых вариантах осуществления L1, как часть линкера, не включает последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119 или SEQ ID NO: 120.

[0204] В некоторых вариантах осуществления только L2, как часть линкера, включает последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID

NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID N0: 119 или SEQ ID NO: 120. В некоторых вариантах осуществления ни L1, ни L2, как часть линкерной последовательности, не включает последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID. NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119 или SEQ ID NO: 120.

[0205] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат первый полипептид, содержащий первую субъединицу мультисубъединичного белка и первый полипептид Fc-домена антитела, где линкер, содержащий GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 118; $(G4S)_3$), соединяет первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, например, с полипептидом Fc-домена антитела IgG4 или полипептидом Fc-домена антитела IgG1. Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся субъединицу многосубъединичного белка и второй полипептид Fc-домена антитела, где линкер, содержащий GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 118; $(G4S)_3$), соединяет вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка со вторым полипептидом Fc-домена антитела, например, с полипептидом Fc-домена антитела IgG4 или полипептидом Fc-домена антитела IgG1.

[0206] В некоторых вариантах осуществления некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат первый полипептид, содержащий первую субъединицу многосубъединичного белка и первый полипептид Fc-домена антитела, где линкер, содержащий GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 118; $(G4S)_3$),соединяет первую субъединицу мультисубъединичного белка с полипептидом Fc-домена, и второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка и второй полипептид Fc-домена антитела, где дополнительная субъединица соединена со вторым полипептидом Fc-домена антитела с помощью линкера, который не содержит GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 118; $(G4S)_3$).

[0207] В некоторых вариантах осуществления некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат первый полипептид, содержащий первую субъединицу мультисубъединичного белка и первый полипептид Fc-домена антитела, где линкер, не содержащий GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 118; $(G4S)_3$), соединяет первую субъединицу мультисубъединичного белка с полипептидом Fc-домена, и второй

полипептид, содержащий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка и второй полипептид Fc-домена антитела, где вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка соединена со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 118; $(G4S)_3$).

[0208] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат первый полипептид, содержащий первую субъединицу мультисубъединичного белка и первый полипептид Fc-домена антитела, где линкер, содержащий (GGGGS)n=2 (SEQ ID NO: 109), соединяет первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом домена Fc антитела, например, полипептидом Fc-домена антитела IgG4 или полипептидом Fc-домена антитела IgG1. Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка и второй полипептид Fc-домена антитела, где линкер, содержащий (GGGGS)n=2 (SEQ ID NO: 109), связывает вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка со вторым полипептидом Fc-домена антитела, например, с полипептидом Fc-домена антитела IgG4 или полипептидом Fc-домена антитела IgG1.

[0209] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению включают линкер, содержащий (GGGGS)n=2 (SEQ ID NO: 109), который соединяет первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, например, с полипептидом Fc-домена антитела IgG4 или полипептидом Fc-домена антитела IgG1, и соединяет вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка со вторым полипептидом Fc-домена антитела, например, с полипептидом Fc-домена антитела IgG4 или полипептидом Fc-домена антитела IgG1.

[0210] В некоторых вариантах осуществления некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат первый полипептид, содержащий первую субъединицу многосубъединичного белка и первый полипептид Fc-домена антитела, где линкер, содержащий (GGGGS)n=2 (SEQ ID NO: 109), соединяет первую субъединицу мультисубъединичного белка с полипептидом Fc-домена, и второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка и второй полипептид Fc-домена антитела, где дополнительная субъединица мультисубъединичного белка соединяется со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, который не содержит (GGGGS)n=2 (SEQ ID NO: 109).

[0211] В некоторых вариантах осуществления некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат первый полипептид, содержащий первую субъединицу мультисубъединичного белка и первый полипептид Fc-домена антитела, где линкер, не содержащий (GGGGS)n=2 (SEQ ID NO: 109), соединяет первую субъединицу мультисубъединичного белка с полипептидом Fc-домена, и второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка и второй полипептид Fc-домена антитела, где вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка соединяется со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим (GGGGS)n=2 (SEQ ID NO: 109).

[0212] Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат первый полипептид, содержащий первую субъединицу мультисубъединичного белка и первый полипептид Fc-домена антитела, где линкер, содержащий (GGGGS)n=1 (SEQ ID NO: 110), соединяет первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, например, с полипептидом Fc-домена антитела IgG4 или полипептидом Fc-домена антитела IgG1. Некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка и второй полипептид Fc-домена антитела, где линкер, содержащий (GGGGS)n=1 (SEQ ID NO: 110), соединяет вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка со вторым полипептидом Fc-домена антитела, например, с полипептидом Fc-домена антитела IgG4 или полипептидом Fc-домена антитела IgG1.

[0213] Некоторые гетеродимерные слитые с Fc белки по настоящему изобретению включают линкер, состоящий из (GGGGS)n 1 (SEQ ID NO: 110), который соединяет первую субъединицу мультисубъединичного белка с первым полипептидом Fc-домена антитела, например, с полипептидом Fc-домена антитела IgG4 или полипептидом Fc-домена IgG1 и связывает вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка со вторым полипептидом Fc-домена антитела, например, с полипептидом Fc-домена антитела IgG4 или полипептидом Fc-домена 20 антител IgG1.

[0214] В некоторых вариантах осуществления некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат первый полипептид, содержащий первую субъединицу многосубъединичного белка и первый полипептид Fc-домена антитела, где линкер, содержащий (GGGGS)n=1 (SEQ ID NO: 110), соединяет первую субъединицу

мультисубъединичного белка с полипептидом Fc-домена, и второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка и второй полипептид Fc-домена антитела, где вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка соединяется со вторым полипептидом Fc-домена антитела с помощью линкера, который не содержит (GGGGS)n=1 (SEQ ID NO: 110).

[0215] В некоторых вариантах осуществления некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат первый полипептид, содержащий первую субъединицу многосубъединичного белка и первый полипептид Fc-домена антитела, где линкер, не содержащий (GGGGS)n=1 (SEQ ID NO: 110), соединяет первую субъединицу мультисубъединичного белка с полипептидом Fc-домена, и второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка и второй полипептид Fc-домена антитела, где вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка соединяется со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим (GGGGS)n=1 (SEQ ID NO: 110).

[0216] В некоторых вариантах осуществления некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат первый полипептид, содержащий первую субъединицу многосубъединичного белка и первый полипептид Fc-домена антитела, где линкер, содержащий (GGGGS)n=1 (SEQ ID NO: 110) последовательность, соединяет первую субъединицу мультисубъединичного белка с полипептидом Fc-домена, и второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка и второй полипептид Fc-домена антитела, где вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка соединяется со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим последовательность (GGGGS)n=2 (SEQ ID NO: 109).

[0217] В некоторых вариантах осуществления некоторые гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению содержат первый полипептид, содержащий первую субъединицу многосубъединичного белка и первый полипептид Fc-домена антитела, где линкер, содержащий последовательность (GGGGS)n=2 (SEQ ID NO: 109), соединяет первую субъединицу мультисубъединичного белка с полипептидом Fc-домена и второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка и второй полипептид Fc-домена антитела, где вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка соединяется со вторым полипептидом Fc-домена антитела линкером, содержащим последовательность (GGGGS)n=1 (SEQ ID NO: 110).

Fc-домен и замены для стимуляции гетеродимеризации

[0218] Сборка белков по настоящему изобретению может быть выполнена путем экспрессии первого полипептида, содержащего первую субъединицу последовательности мультисубъединичного белка, слитую с первым полипептидом Fc-домена антитела (например, последовательность варианта Fc антитела IgG4 или последовательность варианта Fc антитела IgG1, как показано в таблице 2), и второго полипептида, содержащего вторую, отличающуюся субъединицу последовательности мультисубъединичного белка, слитую со вторым полипептидом Fc-домена антитела (например, последовательность варианта Fc антитела IgG4 или последовательность варианта Fc антитела IgG1, как показано в таблице 2) в той же клетке, что приводит к сборке гетеродимерного Fc-слитого белка по изобретению. Собранные белки содержат гетеродимерные полипептиды Fc-домена, при этом первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела связаны друг с другом. Содействие предпочтительной сборке гетеродимеров Fc может быть достигнуто путем включения различных мутаций в домен CH3 каждой константной области тяжелой цепи антитела, как показано в US13/494870, US16/028850, US11/533709, US12/875015, US13/289934, US14/773418, US12/811207, US13/866756, US14/647480 и US14/830336. Например, мутации могут быть сделаны в домене CH3 на основе человеческого IgG1 и включают отдельные пары аминокислотных замен внутри первого полипептида Fc-домена антитела и второго полипептида Fc-домена антитела, которые позволяют данным двум цепям селективно гетеродимеризоваться друг с другом. Все положения аминокислотных замен, проиллюстрированные ниже, пронумерованы в соответствии с индексом EC, как у Kabat.

[0219] В одном сценарии аминокислотная замена в первом полипептиде Fc-домена антитела заменяет исходную аминокислоту более крупной аминокислотой, выбранной из аргинина (**R**), фенилаланина (**F**), тирозина (**Y**) или триптофана (**W**), и по меньшей мере одна аминокислотная замена во втором полипептиде Fc-домена антитела заменяет исходную (исходные) аминокислоту (аминокислоты) аминокислотой (аминокислотами) меньшего размера, выбранной из аланина (A), серина (S), треонина (T) или валина (V), так что более крупная аминокислотная замена (выпуклость) укладывается на поверхность более мелких аминокислотных замен (полость). Например, один полипептид Fc-домена антитела может

включать замену T366W, и другой может включать три замены, включая T366S, L368A и Y407V.

[0220] Первый полипептид, содержащий первую субъединицу последовательности многосубъединичного белка, или второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся субъединицу последовательности многосубъединичного белка по изобретению, может быть необязательно связан с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичной константной области антитела, такой как константная область IgG, включая шарнир, домены CH2 и CH3 с доменом CH1 или без него. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична константной области человеческого антитела, такой как константная область человеческого IgG1, константная область IgG2, константная область IgG3 или константная область IgG4. В некоторых других вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична константной области антитела от другого млекопитающего, такого как кролик, собака, кошка, мышь или лошадь. Одна или несколько мутаций могут быть включены в константную область по сравнению с константной областью человеческого IgG1, например, в Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и/или K439. Примеры замен включают, например, Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, T350V, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L3 KW64, E3536E, Q64E, E357L3, K6036E, E356E, E357L3, K6036E,, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, D394D, K392F, K392M, K392V, K394F, K394F, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

[0222] Аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, показанных в таблице 8.

Таблица 8		
	Первый полипептид	**Второй полипептид**
Набор 1	S364E/F405A	Y349K/T394F
Набор 2	S364H/D401K	Y349T/T411E
Набор 3	S364H/T394F	Y349T/F405A
Набор 4	S364E/T394F	Y349K/F405A
Набор 5	S364E/T411E	Y349K/D401K
Набор 6	S364D/T394F	Y349K/F405A
Набор 7	S364H/F405A	Y349T/T394F
Набор 8	S364K/E357Q	L368D/K370S
Набор 9	L368D/K370S	S364K
Набор 10	L368E/K370S	S364K
Набор 11	K360E/Q362E	D401K
Набор 12	L368D/K370S	S364K/E357L
Набор 13	K370S	S364K/E357Q
Набор 14	F405L	K409R
Набор 15	K409R	F405L

[0223] В качестве альтернативы, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, показанных в таблице 9.

Таблица 9		
	Первый полипептид	**Второй полипептид**
Набор 1	K409W	D399V/F405T

Набор 2	Y349S	E357W
Набор 3	K360E	Q347R
Набор 4	K360EIK409W	Q347R/D399V/F405T
Набор 5	Q347EIK360EIK409W	Q347R/D399V/F405T
Набор 6	Y349SIK409W	E357W/D399V/F405T

[0224] В качестве альтернативы, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующего набора замен, показанного в таблице 10.

Таблица 10		
	Первый полипептид	**Второй полипептид**
Set 1	T366K/L351K	L351DIL368E
Set 2	T366K/L351K	L351D/Y349E
Set 3	T366K/L351K	L351D/Y349D
Set 4	T366K/L351K	L351D/Y349EIL368E
Set 5	T366K/L351K	L351D/Y349DIL368E
Set 6	E356K/D399K	K392DIK409D

[0225] В качестве альтернативы, по меньшей мере одна аминокислотная замена в каждой полипептидной цепи может быть выбрана из таблицы 11.

Таблица 11	
Первый полипептид	**Второй полипептид**
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y4071, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F K392D, K392E, K409F, K409W, T411D и T411E

[0226] В качестве альтернативы, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора замен в таблице 12, где положение(я), указанное в столбце «Первый полипептид», заменено любой известной отрицательно заряженной аминокислотой, и положение(а), указанное во втором столбце полипептида, заменено любой известной положительно заряженной аминокислотой.

Таблица 12	
Первый полипептид	**Второй полипептид**
K392, K370, K409 или K439	D399, E356 или E357

[0227] В качестве альтернативы, по меньшей мере, одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора в таблице 13, где положение(я), указанное в столбце «Первый полипептид», заменено любой известной положительно заряженной аминокислотой, и положение(а), указанное во втором столбце полипептида, заменено любой известной отрицательно заряженной аминокислотой.

Таблица 13	
Первый полипептид	**Второй полипептид**
D399, E356 или E357	K409, K439, K370 или K392

[0228] В качестве альтернативы, по меньшей мере, одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора в таблице 14.

Таблица 14	
Первый полипептид	**Второй полипептид**
T350V, L351Y, F405A и Y407V	T350V, T366L, K392L и T394W

[0229] В качестве альтернативы или дополнительно, структурная стабильность гетеродимерного Fc-слитого белка по изобретению может быть увеличена путем введения

S354C либо в первую, либо во вторую полипептидную цепь и Y349C в противоположную полипептидную цепь, что образует искусственную дисульфидную связь на границе двух полипептидов.

[0230] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении T366 и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из T366, L368 и Y407.

[0231] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из T366, L368 и Y407, и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении T366.

[0232] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из E357, K360, Q362, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411, и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411.

[0233] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411, и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из E357, K360, Q362, S364, L368, K370, T394, D401, F405 и T411.

[0234] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной

последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из L351, D399, S400 и Y407, и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из T366, N390, K392, K409 и T411.

[0235] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из T366, N390, K392, K409 и T411, и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из L351, D399, S400 и Y407.

[0236] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, Y349, K360 и K409, и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, E357, D399 и F405.

[0237] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, E357, D399 и F405, и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из Y349, K360, Q347 и K409.

[0238] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из K370, K392, K409 и K439, и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной

последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из D356, E357 и D399.

[0239] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из D356, E357 и D399, и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из K370, K392, K409 и K439.

[0240] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из L351, E356, T366 и D399, и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из Y349, L351, L368, K392 и K409.

[0241] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из Y349, L351, L368, K392 и K409, и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или нескольких положениях, выбранных из L351, E356, T366 и D399.

[0242] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой S354C и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой Y349C.

[0243] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой Y349C и аминокислотная

последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой S354C.

[0244] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами 0347R, D399V и F405T.

[0245] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами 0347R, D399V и F405T и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W.

[0246] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи антитела константной области отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366W и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи антитела константной области отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V.

[0247] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи антитела константной области отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366W.

[0248] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи антитела константной области отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W.

[0249] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W и аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи антитела константной области отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V.

[0250] Специалист в данной области техники поймет, что во время продуцирования и/или хранения белка N-концевой глутамат (E) или глутамин (Q) может циклизоваться с образованием лактама (например, спонтанно или катализируемым присутствующим ферментом во время продуцирования и/или хранения).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, где N-концевой остаток аминокислотной последовательности полипептида представляет собой E или Q, в данном документе также рассматривается соответствующая аминокислотная последовательность с заменой E или Q на пироглутамат.

[0251] Специалист в данной области техники также поймет, что во время продуцирования и/или хранения белка C-концевой лизин (K) белка может быть удален (например, спонтанно или катализируемым ферментом, присутствующим во время продуцирования и/или хранения). Такое удаление K часто наблюдается с белками, которые содержат Fc-домен на его C-конце. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, где C-концевой остаток аминокислотной последовательности полипептида (например, последовательность Fc-домена) представляет собой K, в данном документе также рассматривается соответствующая аминокислотная последовательность с удаленным K.

Мутации для снижения эффекторных функций

[0252] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий (a) первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела и первую субъединицу мультисубъединичного белка; и (b) второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка, причем каждый первый и второй полипептид Fc-домена антитела содержит разные мутации, способствующие гетеродимеризации, причем первый и/или второй полипептид Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций, которые снижают эффекторную функцию Fc, и где первая субъединица и вторая,

отличающаяся субъединицы мультисубъединичного белка связаны друг с другом. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем документе гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий одну или несколько мутаций, которые снижают эффекторную функцию Fc, имеет повышенную активность в отношении ингибирования роста опухоли, чем его аналог без мутации(й) Fc, которая уменьшает эффекторную функцию. Рассматриваемые в данном документе мутации включают замену, вставку и делецию аминокислотных остатков. Все положения аминокислот в Fc-домене или шарнирной области, описанных в данном документе, пронумерованы в соответствии с нумерацией ЕС.

[0253] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций, которые снижают способность полипептида Fc-домена вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность (**ADCC**) и/или антителозависимый клеточный фагоцитоз (**ADCP**). **ADCC** и **ADCP** обычно опосредуются рецептором Fc. Например, в некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой последовательности антител человеческого IgG (например, человеческого IgG1, человеческого IgG2, человеческого IgG3 или человеческого IgG4). Fc-рецепторы человеческого IgG, также называемые Fc-гамма-рецепторами (FcγRs), включают, но не ограничиваются этим, активирующие Fc-гамма-рецепторы FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIIA (CD 16 или CD 16 A) и FcγRIIIB (CD16B), и ингибитор Fc гамма-рецептора FcγRI IB (CD32B). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению включает одну или несколько мутаций для уменьшения связывания с активирующим FcγR (например, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA или FcγRIIIB) в первом и/или втором полипептидах. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению включает одну или несколько мутаций для увеличения связывания с ингибирующим FcγR (например, FcγRIIB) в первом и/или втором полипептидах.

[0254] Мутации Fc, которые уменьшают связывание с активирующим FcγR и/или увеличивают связывание с ингибирующим FcγR, известны в данной области техники. Например, внутри шарнирной области и области Fc связывание с CD16 опосредуется шарнирной областью и доменом CH2. Например, в человеческом IgG1 взаимодействие с CD 16, в первую очередь, сосредоточено на аминокислотных остатках Asp 265-Glu 269, Asn 297-Thr 299, Ala 327-Ile 332, Leu 234-Ser 239 и углеводном остатке N-ацетил-D-глюкозамин в

домене CH2 (*см.* Sondermann *et al.*, Nature, 406 (6793): 267-273). На основе известных доменов могут быть выбраны мутации для увеличения или уменьшения аффинности связывания с CD16, например, с использованием библиотек фагового отображения или библиотек кДНК, отображаемых на поверхности дрожжей, или могут быть разработаны на основе известной трехмерной структуры взаимодействия.

[0255] Как указано в статье Want *et al.*, Protein Cell (2018) 9 (l): 63-73, области, включающие положения аминокислот 232-239, 265-270, 296-299 и 325-332, участвуют в активации связывания FcγR в соответствии с кристаллической структурой человеческого IgG1 Fc. У Wang *et al.* также раскрывается, что мутации L235E и F234A/L235A человеческого IgG4, L234A/L235A мутации человеческого IgG1 и мутации N297 (например, N297A, N297Q, N297G или N297D) антител IgG снижают активирующее связывание FcγR. Как описано в патенте США № 8969526, мутация в положении 329 (например, P329A, P329G или P329R) также снижает активацию связывания FcγR.

Дополнительные положения аминокислот и мутации (например, мутация E233P), участвующие в активации связывания FcγR, раскрыты в патенте США № 7943743 и Isaacs *et al.*, J. Immunol. (1998) 161: 3862-69.

[0256] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат мутацию (например, замену относительно человеческого IgG1 дикого типа) в одном или нескольких положениях, выбранных из 233, 234, 235, 297 и 329. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела IgG1 представляют собой полипептиды Fc-доменов человеческих IgG1-антител, содержащие мутацию(и) E233P; L234A (человеческий IgG1) или F234A (человеческий IgG4); L235A или L235E; N297A, N297Q, N297G или N297D; и/или P329A, P329G или P329R. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG1-антитела, содержащие мутации L234A и L235A. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG1-антитела, содержащие мутации L234A, L235A и P329A. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG4-антитела, содержащие мутацию L235E. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-

домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG1-антитела, содержащие мутации L235E и P329A.

[0257] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций, которые снижают способность полипептида Fc-домена вызывать комплемент-зависимую цитотоксичность (**CDC**). **CDC** обычно опосредуется компонентом комплемента (например, Clq). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению включает одну или несколько мутаций для уменьшения связывания с компонентом комплемента (например, Clq) в первом и/или втором полипептидах.

[0258] Мутации Fc, снижающие связывание с Clq, известны в данной области техники. Например, как раскрыто в патентах США №№ 5648260 и 5624821, аминокислотные остатки Fc в положениях 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322 участвуют в связывании Clq. Как описано в Tao *et al.*, J. Exp. Med. (1993) 178: 661-667 и Brekke *et al.*, Eur. J. Immunol. (1994) 24: 2542-47, остаток Pro в положении 331 участвует в связывании Clq. Как описано в Idusogie *et al*, J. Immunol. (2000) 164: 4178-84, мутации Fc в положениях 270 (например, D270A), 322 (K322A), 329 (например, P329A) и 331 (например, P331A, P331S или P331G) снижали связывание Clq.

[0259] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат мутацию (например, замену относительно человеческого IgG1 дикого типа) в одном или нескольких положениях, выбранных из 234, 235, 236, 237, 270, 297, 318, 320, 322, 329 и 331. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена антитела IgG1 человека, содержащие мутации G237A, A330S, P331S и/или P329A. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена антитела человека IgG1, содержащие мутации G237A, A330S и P331S. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG1-антитела, содержащие мутацию P329A.

[0260] Мутации, снижающие **ADCC** и/или **ADCP**, и мутации, снижающие **CDC**, можно комбинировать. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций, которые снижают способность полипептида Fc-домена индуцировать **ADCC** и/или **ADCP**, и дополнительно содержат одну

или несколько мутаций, которые снижают способность полипептида Fc-домена индуцировать **CDC**. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат одну или несколько мутаций, которые снижают способность полипептида Fc-домена индуцировать ADCC и/или ADCP, и дополнительно содержат одну или несколько мутаций. которые снижают способность полипептида Fc-домена индуцировать CDC.

[0261] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению с Fc IgG4 включает одну или несколько мутаций для уменьшения связывания с FcyR (например, FcyRI, FcyRIIA, FcyRIIB, FcyRIRIIA или FcyRIIIB) или с компонентом комплемента (например, Clq) в первом и/или втором полипептидах. Такие мутации полезны для снижения эффекторных функций. Например, белок по настоящему изобретению может включать мутации SPLE (S228P и L235E), мутации SPLEPA (S228P, L235E и P329A) или мутации SPLEPG (S228P, L235E и P329G).

[0262] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению с Fc IgG1 включает одну или несколько мутаций для уменьшения связывания с FcyR (например, FcyRI, FcyRIIA, FcyRIIB, FcyRIIIA или FcyRIIIB) или компонентом комплемента (например, Clq) в первом и/или втором полипептидах. Такие мутации применимы для снижения эффекторных функций. Например, белок по настоящему изобретению может включать мутации LALA (L234A и L235A), мутации LALAPA (L234A, L235A и P329A), мутации LALAPG (L234A, L235A и P329G) или мутации LALEGAASPS (L234A, L235E, G237A, A330S и P331S).

[0263] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению включает первый полипептид Fc-домена антитела IgG4 или IgG1 и второй полипептид Fc-домена антитела IgG4 или IgG1, каждый из которых содержит мутацию P329G или P329A.

[0264] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела содержат мутацию, выбранную из A330S и P331S.

[0265] В некоторых вариантах осуществления изобретения первый полипептид Fc-домена антитела и второй полипептид Fc-домена антитела содержат мутации A330S и P331S.

[0266] В некоторых вариантах осуществления в первом полипептиде гетеродимерного Fc-слитого белка по настоящему изобретению первая субъединица мультисубъединичного белка слита с первым полипептидом Fc-домена антитела первым линкером. В некоторых

вариантах осуществления во втором полипептиде гетеродимерного Fc-слитого белка по настоящему изобретению вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела с помощью второго линкера. Аминокислотные последовательности линкеров, подходящие для такого использования, описаны под заголовками «Конструкции IgG4» и «Конструкции IgG1». Дополнительные линкерные последовательности, подходящие для использования в первом и/или втором полипептидах, включают, но не ограничиваются ими, шарнирные последовательности IgG дикого типа (например, IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека или IgG4 человека) и их мутантные формы. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго линкеров содержит аминокислотную последовательность ESKYGPPCPPAPEFXGG, где X представляет собой L или E (SEQ ID NO: 280), или SKYGPPCPPCPAPEFXGG, где X представляет собой L или E (SEQ ID NO: 28l). В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго линкеров содержит аминокислотную последовательность ESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 282) или SKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 283). В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго линкеров содержит аминокислотную последовательность ESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 284) или
SKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 285).

Период полураспада в сыворотке

[0267] Гетеродимерные Fc-слитые белки согласно изобретению имеют фармакокинетические свойства, подходящие для терапевтического применения. Например, в некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению имеет период полужизни в сыворотке, составляющий по меньшей мере около 50 часов. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению имеет период полужизни в сыворотке, составляющий по меньшей мере около 100 часов.

[0268] В некоторых вариантах осуществления через 50 часов после внутривенного введения субъекту концентрация в сыворотке гетеродимерного Fc-слитого белка по настоящему изобретению составляет по меньшей мере 10% от сывороточной концентрации белка по настоящему изобретению через 1 час после введения указанному субъекту.

[0269] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок согласно изобретению имеет период полужизни в сыворотке, который по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% длиннее, чем у мультисубъединичного белка, не слитого с полипептидами Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий последовательность белка мультисубъединичного белка согласно настоящему изобретению, имеет период полужизни в сыворотке, который по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6 в 7, 8, 9, 10, 15 или 20 раз длиннее, чем у мультисубъединичного белка, не слитого с полипептидами Fc-домена.

Удерживание в опухоли

[0270] Гетеродимерные Fc-слитые белки по настоящему изобретению могут необязательно включать дополнительные свойства для усиления удерживания белков на участке опухоли. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетеродимерный Fc-слитый белок дополнительно содержит протеогликан-связывающий домен, коллаген-связывающий домен и/или связывающий гиалуроновую кислоту домен. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок дополнительно содержит протеогликан-связывающий домен, который связывает один или несколько протеогликанов (например, протеогликаны, известные в данной области техники, например, как описано в Lozzo *et al*, Matrix Bio (2015) 42:11-55; и Nikitovic *et al.*, Frontiers in Endocrinology (2018) 9:69), которые присутствуют в опухоли (например, на поверхности опухолевой клетки, в перицеллюлярном матриксе опухоли или во внеклеточном матриксе опухоли). В некоторых вариантах осуществления коллаген-связывающий домен связывает один или несколько коллагенов, которые присутствуют в опухоли (например, на поверхности опухолевой клетки, в перицеллюлярном матриксе опухоли или во внеклеточном матриксе опухоли). В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок дополнительно содержит кислотосвязывающий домен, который связывается с одной или более гиалуроновой кислотой, которые присутствуют в опухоли. Такие гетеродимерные Fc-слитые белки обладают повышенным удерживанием в опухолях и могут вводиться субъекту внутриопухолево с более низкой дозой и/или частотой.

[0271] В некоторых вариантах осуществления протеогликан-связывающий домен, входящий в состав гетеродимерного Fc-слитого белка, связывает один или несколько протеогликанов, которые специфически экспрессируются в опухоли (например, на

поверхности опухолевой клетки, в перицеллюлярном матриксе опухоли или во внеклеточном матриксе опухоли). В некоторых вариантах осуществления коллаген-связывающий домен, содержащийся в гетеродимерном слитом с Fc белке, связывает один или несколько коллагенов, которые специфически экспрессируются в опухоли (например, на поверхности опухолевой клетки, в перицеллюлярном матриксе в опухоли или в внеклеточный матрикс в опухоли). Такие гетеродимерные Fc-слитые белки могут быть обогащены в опухолях после введения (например, внутривенного, подкожного или легочного введения) и обладают повышенным удерживанием в опухолях, что позволяет введение в более низкой дозе и/или частоте.

[0272] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению дополнительно содержит протеогликан-связывающий домен, который связывает один или несколько протеогликанов, выбранных из синдекана, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), бетагликана, фосфакана, глипикана, перлекана, агрина, коллагена (например, коллаген IX, XII, XV или XVIII), гиалектана, аггрекана, версикана, нейрокана, бревикана и небольшого протеогликана, богатого лейцином (small leucine-rich proteoglycan (SLRP)). Протеогликаны, причастные к раку, включают, но не ограничиваются ими, коллаген, синдекан (например, синдекан-1 или синдекан-2), серглицин, CSPG4, бетагликан, глипикан (например, глипикан-1 или глипикан-3), перлекан, версикан, бревикан и SLPR (например, декорин, бигликан, аспорин, фибродулин и люмикан). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления протеогликан-связывающий домен, входящий в состав гетеродимерного Fc-слитого белка, связывает один или несколько протеогликанов, выбранных из синдекана (например, синдекан-1 или синдекан-2), серглицина, CSPG4, бетагликана, глипикана (например, глипикан-1 или глипикан-3), перлекана, версикана, бревикана и SLPR. В некоторых вариантах осуществления протеогликан-связывающий домен, содержащийся в гетеродимерном слитом с Fc белке, связывает один или несколько SLPR, выбранных из декорина, бигликана, аспорина, фибродулина и люмикана.

[0273] Протеогликан-связывающий домен, входящий в состав гетеродимерного Fc-слитого белка, может представлять собой белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), пептид (например, часть протеогликан-связывающего белка или его вариант), аптамер, небольшую молекулу или их комбинацию. Протеогликан-связывающие домены также известны в данной области техники. Например, синдекан-связывающие домены

раскрыты в патентах США №№ 6,566,489, 8,647,828 и 10,124,038; в публикации патентной заявки США № 2009/0297479; и публикации патентной заявки PCT № WO2018199176A1. CSPG4-связывающие домены раскрыты в патентах США №№ 9,801,928 и 10,093,745; и в публикации патентных заявок США №№ 2016/0032007, 2017/0342151 и 2018/0072811. b-Гликан-связывающие домены раскрыты в патенте США № 7,455,839. Глипикан-связывающие домены раскрыты в патентах США №№ 7,919,086, 7,776,329, 8,680,247, 8,388,937, 9,260,492, 9,394,364, 9,790,267, 9,522,940 и 9,409,994; публикации патентных заявок США №№ 2004/0236080, 2011/0123998, 2018/0244805, 2018/0230230 и 2018/0346592; европейском патенте № 2270509; и в публикации патентных заявок PCT № WO2017053619A1, WO2018026533 A1, WO2018165344A1 и WO2018199318A1. Перлекан-связывающие домены раскрыты в патенте США № 10,166,304. Декорин-связывающие домены раскрыты в патенте США № 6517838 и в публикации заявки на патент PCT №№ W02000021989A1, W02000077041A2 и W02000078800A2.

[0274] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению дополнительно содержит коллаген-связывающий домен. Коллаген представляет собой класс белков, имеющих по меньшей мере 28 различных типов, идентифицированных у позвоночных. Каждый тип коллагена имеет свои уникальные структурные характеристики и характер распределения, как описано в Fang *et al.*, Tumor Biol. (2014) 35:2871-82 и Xiong *et al.*, J. Cancer Metasta. Treat. (2016) 2:357-64. Различные типы коллагенов участвуют в развитии рака, включая, но не ограничиваясь ими, Col3Al, Col5A2, Col6, Col7Al, Col15Al, Col19Al и Col22Al. Коллаген-связывающий домен может представлять собой белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), пептид (например, часть связывающего коллаген белка или его вариант), аптамер, небольшую молекулу или их комбинацию. Коллаген-связывающие домены известны в данной области техники и раскрыты, например, в патентах США №№ 5,788,966, 5,587,360, 5,851,794, 5,741,670, 5,849,701, 6,288,214, 6,387,663, 6,908,994, 7,169,902, 7,488,792, 7,820,401, 8,956,612, 8,642,728 и 8,906,649 и публикации патентных заявок США №№ 2007/0161062, 2009/0142345 и 2012/0100106.

[0275] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению дополнительно содержит домен, связывающий гиалуроновую кислоту. Домен, связывающий гиалуроновую кислоту, может представлять собой белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), пептид (например, часть

связывающего гиалуроновую кислоту белка или его вариант), аптамер, небольшую молекулу или их комбинацию. Домены, связывающие гиалуроновую кислоту, известны в данной области и раскрыты, например, в патентах США №№ 6,864,235, 8,192,744, 8,044022, 8,163,498, 8,034,630, 9,217,016, 9,795,686 и 9,751,919 и в публикации патентных заявок США №№ 2002/0055488. и 2007/0259380.

[0276] Протеогликан-связывающий домен, коллаген-связывающий домен и/или связывающий гиалуроновую кислоту домен, если присутствует, может находиться в любом положении гетеродимерного Fc-слитого белка. Например, в некоторых вариантах осуществления, когда субъединицы IL-12 расположены на N-конце полипептидов Fc-домена антитела, протеогликан-связывающий домен, коллаген-связывающий домен и/или связывающий гиалуроновую кислоту домен, как раскрыто в настоящем документе, могут быть слитыми с C-концом первого полипептида Fc-домена антитела и/или с C-концом второго полипептида Fc-домена антитела. В некоторых вариантах осуществления, когда субъединицы IL-12 расположены на C-конце по отношению к полипептидам Fc-домена антитела, протеогликан-связывающий домен, коллаген-связывающий домен и/или связывающий гиалуроновую кислоту домен, как раскрыто в настоящем документе, могут быть слиты с N-концом первого полипептида Fc-домена антитела и/или с N-концом второго полипептида Fc-домена антитела.

[0277] Протеогликан-связывающий домен, коллаген-связывающий домен и/или связывающий гиалуроновую кислоту домен, если он присутствует, могут быть слиты с остальной частью гетеродимерного Fc-слитого белка через линкер. В некоторых вариантах осуществления протеогликан-связывающий домен слит с остальной частью гетеродимерного Fc-слитого белка через пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер включает описанный в данном документе спейсерный пептид.

II. Способы получения

[0278] Белки по настоящему изобретению могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК, хорошо известной специалисту в данной области техники. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый полипептид, включающий первую субъединицу последовательности мультисубъединичного белка, слитую с первым полипептидом Fc-домена антитела, может

быть клонирована в первый экспрессионный вектор; вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй полипептид, включающий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединицы, слитую со вторым полипептидом Fc-домена антитела, может быть клонирована во второй экспрессионный вектор; и первый и второй экспрессионные векторы можно стабильно трансфицировать вместе в клетки-хозяева для получения мультимерных белков.

[0279] Для достижения наивысшего выхода белка можно исследовать различные соотношения первого и второго векторов экспрессии для определения оптимального соотношения для трансфекции в клетки-хозяева. После трансфекции отдельные клоны могут быть выделены для создания банка клеток с использованием способов, известных в данной области техники, таких как ограниченное разведение, ELISA, FACS, микроскопия или Clonepix.

[0280] Клоны можно культивировать в условиях, подходящих для увеличения масштаба биореактора и сохранения экспрессии белков по настоящему изобретению. Белки могут быть выделены и очищены с использованием способов, известных в данной области техники, включая центрифугирование, глубинную фильтрацию, лизис клеток, гомогенизацию, замораживание-оттаивание, аффинную очистку, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, хроматографию обмена с гидрофобным взаимодействием и хроматографию в смешанном режиме.

III. Фармацевтические композиции

[0281] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат эффективное количество белка, описанного в данном документе. Композиция может быть составлена для использования в различных системах доставки лекарств. Один или несколько физиологически приемлемых эксципиентов или носителей также могут быть включены в композицию для правильной рецептуры. Подходящие составы для использования в настоящем описании можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985. Для краткого обзора способов доставки лекарств см., например, Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

[0282] Состав для внутривенной доставки лекарственного средства по настоящему раскрытию может содержаться в пакете, ручке или шприце. В некоторых вариантах осуществления пакет может быть соединен с каналом, содержащим трубку и/или иглу. В некоторых вариантах осуществления состав может быть лиофилизированным составом или

жидким составом. В некоторых вариантах осуществления состав может быть высушенным сублимацией (лиофилизированным) и содержаться в около от 12 до 60 флаконах. В некоторых вариантах осуществления состав может быть лиофилизированным, и 45 мг лиофилизированного состава может содержаться в одном флаконе. В некоторых вариантах осуществления от около 40 мг до около 100 мг лиофилизированного состава может содержаться в одном флаконе. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав из 12, 27 или 45 флаконов объединяют для получения терапевтической дозы белка в препарате для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления состав может быть жидким и храниться в количестве от около 250 мг/флакон до около 1000 мг/флакон. В некоторых вариантах осуществления состав может быть жидким и храниться в количестве около 600 мг/флакон. В некоторых вариантах осуществления состав может быть жидким и храниться в количестве около 250 мг/флакон.

[0283] Гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению может существовать в жидком водном фармацевтическом составе, включающем эффективное количество белка в забуференном растворе, образующем состав.

[0284] Данные композиции можно стерилизовать обычными способами стерилизации или можно стерилизовать фильтрованием. Полученные водные растворы могут быть упакованы для применения как есть или лиофилизированы, при этом лиофилизированный препарат перед введением объединяют со стерильным водным носителем. pH препаратов обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 или от 6 до 8 и наиболее предпочтительно от 7 до 8, например от 7 до 7,5. Полученные композиции в твердой форме могут быть упакованы в несколько единиц однократной дозы, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеупомянутого средства или средств. Композиция в твердой форме также может быть упакована в контейнер для произвольного количества.

[0285] В некоторых вариантах осуществления настоящее описание обеспечивает состав с увеличенным сроком хранения, включающий гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему раскрытию, в комбинации с маннитом, моногидратом лимонной кислоты, цитратом натрия, дигидратом динатрийфосфата, дигидратом дигидрофосфата натрия, хлоридом натрия, полисорбатом 80, водой и гидроксидом натрия.

[0286] В некоторых вариантах осуществления готовят водную композицию, включающую гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему раскрытию в pH-буферном растворе. Буфер по настоящему изобретению может иметь pH в диапазоне от около 4 до около 8,

например, от около 4,5 до около 6,0, или от около 4,8 до около 5,5, или может иметь pH от около 5,0 до около 5,2. Промежуточные диапазоны значений pH по сравнению с приведенными выше значениями pH также должны быть частью данного раскрытия. К примеру, должны быть включены диапазоны значений, используя комбинацию любого из указанных выше значений, приведенных в качестве верхних и/или нижних пределов. Примеры буферов, которые будут контролировать pH в данном диапазоне, включают ацетат (например, ацетат натрия), сукцинат (такой как сукцинат натрия), глюконат, гистидин, цитрат и буферы с другими органическими кислотами.

[0287] В некоторых вариантах осуществления состав включает буферную систему, которая содержит цитрат и фосфат для поддержания pH в диапазоне от около 4 до около 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон pH может составлять от около 4,5 до около 6,0 или от около 4,8 до около 5,5 или в диапазоне pH от около 5,0 до около 5,2. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает моногидрат лимонной кислоты, цитрат натрия, дигидрат динатрийфосфата и/или дигидрат дигидрофосфата натрия. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает около 1,3 мг/мл лимонной кислоты (например, 1,305 мг/мл), около 0,3 мг/мл цитрата натрия (например, 0,305 мг/мл), около 1,5 мг/мл дигидрата динатрийфосфата (например, 1,53 мг/мл), около 0,9 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия (например, 0,86) и около 6,2 мг/мл хлорида натрия (например, 6,165 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления буферная система включает от 1 до 1,5 мг/мл лимонной кислоты, от 0,25 до 0,5 мг/мл цитрата натрия, от 1,25 до 1,75 мг/мл дигидрата динатрийфосфата, от 0,7 до 1,1 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия и от 6,0 до 6,4 мг/мл хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления pH композиции регулируют гидроксидом натрия.

[0288] Полиол, который действует как тонизирующее средство и может стабилизировать антитело, также может быть включен в состав. Полиол добавляют к препарату в количестве, которое может варьироваться в зависимости от желаемой изотоничности препарата. В некоторых вариантах осуществления водный состав может быть изотоническим. Количество добавляемого полиола также может быть изменено в зависимости от молекулярной массы полиола. Например, меньшее количество моносахарида (например, маннит) может быть добавлено по сравнению с дисахаридом (таким как трегалоза). В некоторых вариантах осуществления полиол, который можно использовать в составе в качестве тонизирующего средства, представляет собой маннит. В некоторых вариантах

осуществления концентрация маннита может составлять от около 5 до около 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от около 7,5 до 15 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от около 10 до 14 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять около 12 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления в состав может быть включен полиолсорбит.

[0289] В состав также могут быть добавлены детергент или поверхностно-активное вещество. Примеры детергентов включают неионные детергенты, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20, 80 и т.д.) или полоксамеры (например, полоксамер 188). Количество добавляемого детергента таково, что оно снижает агрегацию сформулированного антитела и/или минимизирует образование частиц в составе и/или снижает адсорбцию. В некоторых вариантах осуществления состав может включать поверхностно-активное вещество, которое представляет собой полисорбат. В некоторых вариантах осуществления состав может содержать детергент полисорбат 80 или Твин 80. Термин твин 80 используется для описания полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеата (см. Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996). В некоторых вариантах осуществления состав может содержать от около 0,1 мг/мл до около 10 мг/мл полисорбата 80 или от около 0,5 мг/мл до около 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления в состав может быть добавлено около 0,1% полисорбата 80.

[0290] В некоторых вариантах осуществления белковый продукт по настоящему раскрытию составлен в виде жидкого состава. Жидкий состав может быть представлен в концентрации 10 мг/мл во флаконе USP/Ph Eur типа I 50R, закрытом резиновой пробкой и запечатанном алюминиевой пробкой с обжимным уплотнением. Пробка может быть изготовлена из эластомера, соответствующего USP и Ph Eur. В некоторых вариантах осуществления флаконы могут быть заполнены с 61,2 мл раствора белкового продукта, чтобы обеспечить экстрагируемый объем 60 мл. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав может быть разбавлен 0,9% физиологическим раствором.

[0291] В некоторых вариантах осуществления жидкий состав согласно настоящему описанию может быть приготовлен в виде раствора с концентрацией 10 мг/мл в сочетании с сахаром на стабилизирующих уровнях. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав может быть приготовлен в водном носителе. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор может быть добавлен в количестве, не превышающем то, которое может

привести к нежелательной или непригодной для внутривенного введения вязкости. В определенных вариантах осуществления сахар может представлять собой дисахариды, например сахарозу. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав может также включать один или несколько из буферного средства, поверхностно-активного вещества и консерванта.

[0292] В некоторых вариантах осуществления pH жидкого состава может быть установлен путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может быть соляной кислотой. В некоторых вариантах осуществления основание может представлять собой гидроксид натрия.

[0293] В дополнение к агрегации, дезамидирование представляет собой часто встречающийся вариант образования продуктов пептидов и белков, которое может происходить во время ферментации, сбора клеток и их отмывания, очистки, хранения лекарственного вещества/лекарственного продукта и во время анализа образцов. Деамидирование представляет собой потерю NH_3-групп белком с образованием сукцинимида как интермедиата, который может подвергаться гидролизу. Сукцинимидный интермедиат приводит к снижению массы исходного пептида на 17 дальтон. Последующий гидролиз приводит к увеличению массы на 18 дальтон. Выделение сукцинимидного интермедиата затруднено из-за его нестабильности в водных растворах. Таким образом, дезамидирование обычно обнаруживается по увеличению массы на 1 дальтон. Дезамидирование аспарагина приводит либо к аспарагиновой, либо к изоаспарагиновой кислоте. Параметры, влияющие на скорость дезамидирования, включают pH, температуру, диэлектрическую проницаемость растворителя, ионную силу, первичную последовательность, локальную конформацию полипептида и третичную структуру. Аминокислотные остатки, прилегающие к Asn в пептидной цепи, влияют на скорость дезамидирования. Gly и Ser, следующие за Asn в белковых последовательностях, приводят к более высокой чувствительности к дезамидированию.

[0294] В некоторых вариантах осуществления жидкий состав по настоящему раскрытию может храниться в условиях pH и влажности, предотвращающих дезаминирование белкового продукта. Интересующий в данном документе водный носитель является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применимым для приготовления жидкого препарата. Иллюстративные носители включают

стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, забуференный фосфатом физиологический раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[0296] Консервант может быть необязательно добавлен в составы по данному описанию для уменьшения действия бактерий. Добавление консерванта может, например, облегчить производство состава для многократного применения (многократного приема).

[0297] Внутривенные (IV) составы могут быть предпочтительным путем введения в определенных случаях, например, когда пациент находится в больнице после трансплантации и получает все лекарства внутривенным путем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав перед введением разбавляют 0,9% раствором хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления разбавленный лекарственный продукт для инъекций является изотоническим и подходит для введения путем внутривенной инфузии.

[0298] В некоторых вариантах осуществления компоненты соли или буфера могут быть добавлены в количестве от 10 мМ до 200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и являются производными различных известных кислот (неорганических и органических) с металлами или аминами, «образующими основания». В некоторых вариантах осуществления буфер может быть фосфатным буфером. В определенных вариантах осуществления изобретения буфер может быть глицинатным, карбонатным, цитратным буферами, и в этом случае ионы натрия, калия или аммония могут служить в качестве противоиона.

[0299] Консервант может быть необязательно добавлен в составы по данному описанию для уменьшения действия бактерий. Добавление консерванта может, например, облегчить производство состава для многократного применения (многократного приема).

[0300] Интересующий в данном документе водный носитель является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применимым для приготовления жидкого препарата. Иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, забуференный фосфатом физиологический раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[0301] Белок по настоящему изобретению может существовать в лиофилизированной композиции, включающей белки и лиопротектор. Лиопротектором может быть сахар, например, дисахариды. В некоторых вариантах осуществления лиопротектор может

представлять собой сахарозу или мальтозу. Лиофилизированный состав может также включать один или несколько из буферного средства, поверхностно-активного вещества, наполнителя и/или консерванта.

[0302] Количество сахарозы или мальтозы, подходящее для стабилизации лиофилизированного лекарственного продукта, может находиться в массовом соотношении белка к сахарозе или мальтозе, составляющем по меньшей мере 1: 2. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение белка к сахарозе или мальтозе может составлять от 1: 2 до 1: 5.

[0303] В некоторых вариантах осуществления pH состава перед лиофилизацией может быть установлен путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может быть соляной кислотой. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемое основание может представлять собой гидроксид натрия.

[0304] Перед лиофилизацией pH раствора, содержащего белок по настоящему раскрытию, можно отрегулировать от 6 до 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон pH для лиофилизированного лекарственного продукта может составлять от 7 до 8.

[0305] В некоторых вариантах осуществления компоненты соли или буфера могут быть добавлены в количестве от 10 мМ до 200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и являются производными различных известных кислот (неорганических и органических) с металлами или аминами, «образующими основания». В некоторых вариантах осуществления буфер может быть фосфатным буфером. В определенных вариантах осуществления изобретения буфер может быть глицинатным, карбонатным, цитратным буферами, и в этом случае ионы натрия, калия или аммония могут служить в качестве противоиона.

[0306] В некоторых вариантах осуществления может быть добавлен «наполнитель». «Наполнитель» представляет собой соединение, которое добавляет массу к лиофилизированной смеси и вносит вклад в физическую структуру лиофилизированной лепешки (например, облегчает получение по существу однородной лиофилизированной лепешки, которая поддерживает структуру с открытыми порами). Иллюстративные наполнители включают маннит, глицин, полиэтиленгликоль и сорбит. Лиофилизированные составы по настоящему изобретению могут содержать такие наполнители.

[0307] Консервант может быть необязательно добавлен в составы по данному описанию для уменьшения действия бактерий. Добавление консерванта может, например, облегчить производство состава для многократного применения (многократного приема).

[0308] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт может быть составлен с водным носителем. Интересующий в данном документе водный носитель является фармацевтически приемлемым (например, безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применимым для приготовления жидкого препарата после лиофилизации. Иллюстративные разбавители включают SWFI, BWFI, pH-буферный раствор (например, забуференный фосфатом физиологический раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

[0309] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт настоящего раскрытия восстанавливается либо с помощью SWFI, USP, либо с помощью 0,9% раствора для инъекций хлорида натрия, USP. Во время восстановления лиофилизированный порошок растворяется в растворе.

[0310] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный белковый продукт настоящего раскрытия состоит из около 4,5 мл воды для инъекций и разбавляется 0,9% физиологическим раствором (раствор хлорида натрия).

[0311] Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента.

[0312] Конкретная доза может быть одинаковой для каждого пациента, например, от 50 до 5000 мг белка. В качестве альтернативы, доза для пациента может быть адаптирована к приблизительной массе тела или площади поверхности пациента. Другие факторы при определении подходящей дозировки могут включать заболевание или состояние, которое необходимо лечить или предотвращать, серьезность заболевания, способ введения, а также возраст, пол и состояние здоровья пациента. Дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения подходящей дозировки для лечения, обычно выполняется специалистами в данной области техники, особенно в свете информации о дозировке и анализов, раскрытых в данном документе. Дозировка также может быть определена с помощью известных анализов для определения используемых доз в сочетании с соответствующими данными

доза-реакция. Дозировка индивидуального пациента может быть скорректирована по мере наблюдения за развитием болезни. Уровни нацеленной конструкции или комплекса в крови пациента можно измерить, чтобы увидеть, нужно ли корректировать дозировку для достижения или поддержания эффективной концентрации. Фармакогеномика может использоваться для определения того, какие целевые конструкции и/или комплексы и их дозировки, наиболее вероятно, будут эффективными для данного человека (Schmitz *et al., Clinica Chimica Acta* 308: 43-53, 2001; Steimer *et al., Clinica Chimica Acta* 308: 33-41, 2001).

[0313] Как правило, дозировки, основанные на массе тела, составляют от около 0,01 мкг до около 100 мг на кг массы тела, например от около 0,01 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 50 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 10 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 1 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 0,1 мкг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 10 мкг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 1 мкг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 50 мкг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 10 мкг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 50 мкг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 100 до около 100 мг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 1 мг до около 100 мг/кг массы тела, от около 1 мг до около 50 мг/кг массы тела, от около 1 мг до около 10 мг/кг массы тела, от около 10 мг до около 100 мг/кг массы тела, от около 10 мг до около 50 мг/кг массы тела, от около 50 мг до около 100 мг/кг массы тела.

[0314] Дозы можно вводить один или несколько раз ежедневно, еженедельно, ежемесячно или ежегодно или даже один раз каждые от 2 до 20 лет. Специалисты в данной области техники могут легко оценить частоту повторения дозирования на основании измеренных времен пребывания и концентраций целевой конструкции или комплекса в жидкостях или тканях организма. Введение по настоящему изобретению может быть внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутриплевральным, интратекальным, внутриполостным, перфузией через катетер или прямой инъекцией внутрь очага поражения. Его можно вводить один или несколько раз в день, один или несколько раз в неделю, один или несколько раз в месяц и один или несколько раз в год. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок (например, гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий субъединицы IL-12) вводят внутриопухолево. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок вводят внутриопухолево в более низкой дозе или с меньшей частотой, чем при системном введении. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок вводят внутриопухолево после введения местного анестетика. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок вводят внутриопухолево при прямой пальпации опухолевой массы.

IV. Терапевтические применения

[0315] В изобретении обеспечиваются способы лечения рака с применением описанного в данном документе гетеродимерного Fc-слитого связывающего белка и/или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. Способы можно применять для лечения различных видов раковых заболеваний путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества описанного в данном документе гетеродимерного Fc-слитого белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, который лечат описанным в данном документе способом, является местнораспространенным злокачественным новообразованием. В некоторых вариантах осуществления местнораспространенное злокачественное новообразование может быть полностью удалено. В некоторых вариантах осуществления местнораспространенное злокачественное новообразование было полностью удалено, и лечение проводится после резекции.

[0316] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению (например, гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий субъединицы IL-12) применяется для лечения запущенного злокачественного новообразования в качестве монотерапии. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению (например, гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий субъединицы IL-12) применяется в качестве адъюванта для активной иммунотерапии тяжелых инфекционных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению (например, гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий субъединицы IL-12) применяется в качестве адъюванта для профилактической вакцинации. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению применяется для лечения миелосупрессии после лучевой терапии.

[0317] Настоящее изобретение также относится к способу снижения гемопоэтической токсичности. Гемопоэтическая токсичность может быть результатом генетических, инфекционных или экологических причин, включая, помимо прочего, облучение и химиотерапию. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания или расстройства, связанного с излучением (например, ионизирующим излучением, альфа-излучением, бета-излучением, гамма-излучением, рентгеновским излучением или нейтронным излучением). Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения миелосупрессии после лучевой терапии, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества гетеродимерного Fc-слитого белка или состава, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления доза лучевой терапии составляет по меньшей мере 1, 5, 10, 15 или 20 Гр. В некоторых вариантах осуществления лучевая терапия вызывает повреждение системы, органа или ткани, выбранных из группы, состоящей из костного мозга, лимфатической системы, иммунной системы, ткани слизистой оболочки, иммунной системы слизистой оболочки, желудочно-кишечной системы, сердечно-сосудистой системы, нервной системы, репродуктивных органов, предстательной железы, яичников, легких, почек, кожи и мозга. В определенных вариантах осуществления способ настоящего изобретения снижает повреждение.

[0318] Предоставленные в данном документе способы применимы при лечении миелосупрессии, вызванной облучением. Соответственно, в некоторых вариантах

осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения миелосупрессии, возникающей в контексте случайного воздействия радиации, причем способ включает введение пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества гетеродимерного Fc-слитого белка или состава, описанного в данном документе.

[0319] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения острого лучевого синдрома (**ARS**), включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества гетеродимерного Fc-слитого белка или состава, описанного в данном документе. **ARS** включает, но не ограничивается ими, гемопоэтический лучевой синдром, желудочно-кишечный лучевой синдром, нервно-сосудистый лучевой синдром и кожный лучевой синдром. Например, гемопоэтический лучевой синдром является результатом, по меньшей мере, частично, истощения пула гемопоэтических стволовых клеток и проявляет признаки лимфопении и гранулоцитопении. Желудочно-кишечный синдром является результатом, по меньшей мере, частично, повреждения стволовых клеток и клеток-предшественников, расположенных в криптах, и неспособности заменить клетки на поверхности ворсинок и проявляет признаки водянистой диареи, обезвоживания, потери электролитов, желудочно-кишечного кровотечения и перфорации. В некоторых вариантах осуществления способ лечения, представленный в настоящем документе, проводится на продромальной стадии **ARS**. Продромальная фаза представляет собой начальную фазу острого заболевания, характеризующуюся симптомами тошноты, рвоты, анорексии, лихорадки, головной боли и/или ранней эритемы кожи, обычно в пределах от 1 до 3 дней после воздействия радиации. В некоторых вариантах осуществления способ лечения, представленный в настоящем документе, проводится на латентной стадии **ARS**. Латентная фаза представляет собой фазу, характеризующуюся улучшением симптомов, но с проявлением лимфопении и гранулоцитопении в лабораторных тестах, и может длиться от нескольких часов до недель в зависимости от дозы воздействия. Лечение в продромальной фазе или латентной фазе может смягчить развитие синдромов в пораженных системах, органах и/или тканях. В некоторых вариантах осуществления способ лечения, представленный в настоящем документе, проводится на стадии манифестного заболевания **ARS**. Лечение на данной стадии может способствовать выздоровлению от **ARS**.

[0320] Настоящее изобретение также относится к способу увеличения выживаемости, пролиферации, дифференцировки и/или активности иммунной клетки, при этом способ

включает контактирование иммунной клетки с гетеродимерным Fc-слитым белком или составом, раскрытым в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку (например, $CD4^+$ Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой NK-клетку.

[0321] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению (например, гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий субъединицы IL-12) применяется при лечении субъекта, у которого диагностирован рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак груди, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, лейкоз, рак легких, лимфому, мезотелиому, меланому, миелому, рак яичников, рак эндометрия, рак простаты, рак поджелудочной железы, почечно-клеточный рак, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак мозга, саркому, нейробластому или плоскоклеточный рак головы и злокачественные клетки шеи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок вводят в качестве монотерапии субъекту, у которого диагностирован рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок вводят в качестве монотерапии субъекту, у которого диагностирована меланома. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак груди. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок вводят в качестве монотерапии субъекту, у которого диагностирован рак груди.

[0322] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака, при этом способ включает введение пациенту только однократной дозы гетеродимерного IL-12-Fc-слитого белка. В некоторых вариантах осуществления однократная доза находится в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать полный ответ на рак. В некоторых вариантах осуществления однократная доза находится в количестве, достаточном для отсрочки или предотвращения рецидива рака.

[0323] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака, при этом способ включает введение пациенту только однократной дозы гетеродимерного IL-12-Fc-слитого белка, содержащего первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и второй полипептид, содержащий

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291, или состава, содержащего гетеродимерный IL-12-Fc-слитый белок и фармацевтически приемлемый носитель.

[0324] В некоторых вариантах осуществления однократная доза гетеродимерного IL-12-Fc-слитого белка, содержащего первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291, или состава, содержащего гетеродимерный IL-12-Fc-слитый белок (например, содержащий SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 291) и фармацевтически приемлемый носитель, находится в количестве, достаточном для индукции полного ответа на рак. В некоторых вариантах осуществления однократная доза находится в количестве, достаточном для отсрочки или предотвращения рецидива рака. В некоторых вариантах осуществления рецидив полностью излеченного рака (например, полный ответ после лечения IL-12-Fc-слитым белком по настоящему изобретению) отсрочивается или предотвращается на срок от 6 месяцев до 72 месяцев или более (например, через 6 месяцев, 12 месяцев, 24 месяца, 36 месяцев, 48 месяцев, 60 месяцев, 72 месяца, 84 месяца или 96 месяцев).

[0325] В некоторых вариантах осуществления рак, который лечили одной или более дозой гетеродимерного IL-12-Fc-слитого белка (например, содержащего первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291), представляет собой метастатический рак. В некоторых вариантах осуществления метастатический рак представляет собой местный, региональный или отдаленный метастатический рак. В некоторых вариантах осуществления однократная или многократная доза гетеродимерного IL-12-Fc-слитого белка (например, содержащего первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291) лечит отдаленный рак, который не является первичным раком исходного органа или ткани и/или прямой мишенью схемы лечения, посредством абсорбционного эффекта. В некоторых вариантах осуществления абсорбционный эффект гетеродимерного IL-12-Fc-слитого белка усиливается во время и/или после плана лечения, включая лучевую и/или химиотерапию. В некоторых вариантах осуществления однократная или многократная доза гетеродимерного IL-12-Fc-слитого белка (например, содержащего первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и второй полипептид, содержащий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 291) лечит рак у пациента, вызывая системный противоопухолевый ответ, определяемый, например, по повышенной экспрессии IFN-γ, CXCL9 и/или CXCL10 в сыворотке и/или опухоли пациента.

V. Комбинированная терапия

[0326] Другой аспект изобретения обеспечивает комбинированную терапию. Описанный в данном документе мультиспецифический связывающий белок можно применять в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами для лечения рака.

[0327] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению (например, гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий субъединицы IL-12) вводят в качестве комбинированной терапии для лечения субъекта, у которого диагностирован рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак груди, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, лейкемию, рак легких, лимфому, мезотелиому, меланому, миелому, рак яичников, рак эндометрия, рак простаты, рак поджелудочной железы, почечно-клеточный рак, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак мозга, саркому, нейробластому или плоскоклеточный рак раковых клеток головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок вводят в качестве комбинированной терапии субъекту, у которого диагностирован рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок вводят в качестве комбинированной терапии субъекту, у которого диагностирована меланома. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак груди. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок вводят в качестве комбинированной терапии субъекту, у которого диагностирован рак груди.

[0328] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению (например, гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий субъединицы IL-12) применяется для лечения запущенного злокачественного новообразования в комбинации с другим терапевтическим средством, выбранным из: цитотоксической химиотерапии; лучевой терапии; антитела, которое нацелено на молекулу, участвующую в противоопухолевом иммунном ответе, такую как CTLA-4, PD-1, PD-L1 или

TGF-b; антитела, которое действует посредством ADCC на антиген, ассоциированный с опухолью; мультиспецифического антитела, связывающего NKG2D, CD16 и опухоль-ассоциированный антиген, необязательно вводимого в сочетании с антителом, нацеленным на PD-1 или PD-L1; персонализированной вакцины против рака; вакцины против рака; и персонализированной вакцины, вводимой в сочетании с антителом, нацеленным на PD-1 или PD-L1.

[0329] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению (например, гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий субъединицы IL-12) применяется для лечения злокачественного новообразования (например, запущенного злокачественного новообразования) в сочетании с другой терапией, включая, но не ограничиваясь этим, терапию, нацеленную на NK (например, терапию CAR-NK), терапию антителами, терапию ингибиторами контрольных точек, дополнительную терапию цитокинами, терапию агонистами врожденной иммунной системы, химиотерапию, терапию целевым агентом, лучевую терапию, адоптивную NK-терапию, терапию трансплантацией стволовых клеток (SCT), терапию агонистическими антителами, терапию Т-клетками с химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor (CAR)), инженерную терапию Т-клеточного рецептора (TCR), мультиспецифический связывающий белок (TriNKET), средство, вызывающее клеточное старение, и терапию вакцинами и/или онколитическими вирусами. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению применяется для лечения злокачественного новообразования (например, запущенного злокачественного новообразования) в комбинации с двумя или более дополнительными видами лечения, выбранными из терапии, нацеленной на NK (например, терапия CAR-NK), терапии антителами, терапии ингибиторами контрольных точек, дополнительной терапии цитокинами, терапии агонистами врожденной иммунной системы, химиотерапии, терапии целевым агентом, лучевой терапии, адоптивной NK-терапии, терапии трансплантацией стволовых клеток (SCT), агонистического антитела, терапии Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR), терапии с использованием Т-клеточного рецептора (TCR), мультиспецифического связывающего белка (TriNKET), средства, вызывающего клеточное старение, и терапии вакцинами и/или онколитическими вирусами.

[0330] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок по настоящему изобретению (например, гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий IL-12)

применяется для лечения местнораспространенного злокачественного новообразования, которое может быть полностью удалено, в комбинации с противораковой вакциной или антителом, нацеленным на PD-1 или PD-L1.

[0331] Белки по изобретению также можно применять в качестве дополнения к хирургическому удалению первичного поражения.

[0332] Количество гетеродимерного Fc-слитого белка по настоящему изобретению (например, гетеродимерного Fc-слитого белка, содержащего IL-12) и дополнительного терапевтического средства и относительное время введения могут быть выбраны для достижения желаемого комбинированного терапевтического воздействия. Например, при назначении комбинированной терапии пациенту, нуждающемуся в таком введении, терапевтические средства в комбинации или фармацевтическая композиция или композиции, содержащие терапевтические средства, могут вводиться в любом порядке, таком как, например, последовательно, одновременно., вместе, одновременно и тому подобное. Кроме того, например, гетеродимерный Fc-слитый белок можно вводить в то время, когда дополнительное терапевтическое средство (средства) оказывает свое профилактическое или терапевтическое действие, или наоборот.

[0333] Как раскрывается в данном документе, способы по изобретению включают совместное введение комбинации гетеродимерного Fc-слитого белка (например, гетеродимерного Fc-слитого белка, содержащего субъединицы IL-12) и дополнительного терапевтического средства. Как раскрывается в данном документе, способы по настоящему изобретению включают совместное введение комбинации гетеродимерного Fc-слитого белка, содержащего субъединицы IL-12, и дополнительного терапевтического средства.

[0334] Совместное введение охватывает способы, в которых гетеродимерный Fc-слитый белок (например, гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий субъединицы IL-12) и дополнительное терапевтическое средство вводятся одновременно, где гетеродимерный Fc-слитый белок и дополнительное терапевтическое средство вводятся последовательно, и когда либо один из гетеродимерного Fc-слитого белка и дополнительного терапевтического средства, либо оба из них вводятся периодически или непрерывно или в любой комбинации: одновременно, последовательно, периодически и/или непрерывно. Квалифицированный специалист поймет, что прерывистое введение не обязательно то же самое, что и последовательное, потому что прерывистое также включает первое введение средства и затем другое введение позже того же самого средства. Более того, квалифицированному

специалисту понятно, что прерывистое введение также включает последовательное введение в некоторых вариантах осуществления, поскольку прерывистое введение действительно включает прерывание первого введения средства введением другого средства перед повторным введением первого средства. Кроме того, квалифицированный специалист также знает, что непрерывное введение может осуществляться несколькими путями, включая внутривенное капельное (IV вливание) или через зонд для кормления и т. д.

[0335] Кроме того, и в более общем смысле, термин «совместно вводимый» охватывает любые и все способы, в которых индивидуальное введение гетеродимерного Fc-слитого белка и индивидуальное введение дополнительного терапевтического средства субъекту перекрываются в течение любого периода времени.

[0336] Частота введения гетеродимерного Fc-слитого белка или дополнительного терапевтического средства субъекту известна в данной области техники как Qnd или qnd, где n представляет собой частоту в днях для последовательного введения данного средства. Например, Q3d представляет собой введение средства один раз в три (3) дня. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение одного из гетеродимерного Fc-слитого белка и/или дополнительного терапевтического средства, или их обоих, или любых их комбинаций для Q1d, Q2d, Q3d, Q4d, Q5d, Q6d, Q7d, Q8d, Q9d, Q10d, Q14d, Q21d, Q28d, Q30d, Q90d, Q120d, Q240d или Q365d.

[0337] В некоторых вариантах осуществления либо один, либо оба из гетеродимерного Fc-слитого белка и/или дополнительного терапевтического средства вводят с перерывами. В определенных вариантах осуществления способ включает введение субъекту одного или обоих гетеродимерного Fc-слитого белка или дополнительного терапевтического средства с задержкой, составляющей по меньшей мере десять (10) минут, пятнадцать (15) минут, двадцать (20) минут, тридцать (30) минут, сорок (40) минут, шестьдесят (60) минут, два (2) часа, три (3) часа, четыре (4) часа, шесть (6) часов, восемь (8) часов, десять (10) часов, двенадцать (12) часов, четырнадцать (14) часов, восемнадцать (18) часов, двадцать четыре (24) часа, тридцать шесть (36) часов, сорок восемь (48) часов, три (3) дня, четыре (4) дня, пять (5) дней, шесть (6) дней, семь (7) дней, восемь (8) дней, девять (9) дней, десять (10) дней, одиннадцать (11) дней), двенадцать (12) дней, тринадцать (13) дней, четырнадцать (14) дней, три (3) недели или четыре (4) недели между введениями. В некоторых вариантах осуществления введение с задержкой следует схеме, когда один из гетеродимерного Fc-

слитого белка и/или дополнительного терапевтического средства, или оба, или любую их комбинацию вводят непрерывно в течение заданного периода времени от около десяти (10) минут до около трехсот шестидесяти пяти (365) дней, а затем не вводят в течение определенного периода времени от около десяти (10) минут до около тридцати (30) дней.

[0338] В некоторых вариантах осуществления либо один из гетеродимерного Fc-слитого белка и/или дополнительного терапевтического средства, либо любую их комбинацию вводят с перерывами, в то время как другой назначают непрерывно. В некоторых вариантах осуществления комбинацию первого эффективного количества гетеродимерного Fc-слитого белка вводят последовательно со вторым эффективным количеством дополнительного терапевтического средства.

[0339] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок и дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления комбинацию первого эффективного количества гетеродимерного Fc-слитого белка вводят последовательно со вторым эффективным количеством дополнительного терапевтического средства. В таких вариантах осуществления комбинация также называется «совместно вводимой», поскольку данный термин включает любые и все способы, в которых субъекту подвергаются оба компонента в комбинации. Однако такие варианты осуществления не ограничиваются комбинацией, вводимой только в одном препарате или композиции. Может оказаться, что определенные концентрации гетеродимерного Fc-слитого белка и дополнительного терапевтического средства более выгодны для доставки через определенные интервалы, и поэтому первое эффективное количество и второе эффективное количество могут изменяться в зависимости от вводимого препарата.

[0340] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок и дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления первое эффективное количество гетеродимерного Fc-слитого белка вводят последовательно после второго эффективного количества дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления второе эффективное количество дополнительного терапевтического средства вводят последовательно после первого эффективного количества гетеродимерного Fc-слитого белка.

[0341] В некоторых вариантах осуществления комбинацию гетеродимерного Fc-слитого белка (например, гетеродимерного Fc-слитого белка, содержащего субъединицы IL-12) и дополнительного терапевтического средства вводят в одном составе. В некоторых вариантах осуществления комбинацию вводят в двух (2) композициях, где первое эффективное количество гетеродимерного Fc-слитого белка вводят в составе, отдельном от композиции второго эффективного количества дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления комбинацию вводят в двух (2) композициях, где первое эффективное количество гетеродимерного Fc-слитого белка вводят в составе, отдельном от композиции второго эффективного количества дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления первое эффективное количество гетеродимерного Fc-слитого белка вводят последовательно после второго эффективного количества дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления второе эффективное количество дополнительного терапевтического средства вводят последовательно после первого эффективного количества гетеродимерного Fc-слитого белка. В некоторых вариантах осуществления вводят гетеродимерный Fc-слитый белок и дополнительное терапевтическое средство; и впоследствии как гетеродимерный Fc-слитый белок, так и дополнительное терапевтическое средство вводят с перерывами в течение по меньшей мере двадцати четырех (24) часов. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок и дополнительное терапевтическое средство вводят по неперекрывающемуся графику через день.

[0342] В некоторых вариантах осуществления первое эффективное количество гетеродимерного Fc-слитого белка вводят не менее чем через четыре (4) часа после второго эффективного количества дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления первое эффективное количество гетеродимерного Fc-слитого белка вводят не менее чем через десять (10) минут, не менее чем через пятнадцать (15) минут, не менее чем через двадцать (20) минут, не менее чем через тридцать (30) минут, не менее чем через сорок (40) минут, не менее чем через шестидесять (60) минут, не менее чем через один (1) час, не менее чем через 2 (два) часа, не менее чем через четыре (4) часа, не менее чем через шесть (6) часов, не менее чем через восемь (8) часов, не менее чем через десять (10) часов, не менее чем через двенадцать (12) часов, не менее чем через двадцать четыре (24) часа, не менее чем через два (2) дня, не менее чем через четыре (4) дня, не менее чем через шесть (6) дней, не менее чем через восемь (8) дней, не менее чем через десять (10)

дней, не менее чем через двенадцать (12) дней, не менее чем через четырнадцать (14) дней, не менее чем через двадцать один (21) день или не менее чем через тридцать (30) дней после второго эффективного количества дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления второе эффективное количество дополнительного терапевтического средства вводится не менее чем через десять (10) минут, не менее чем через пятнадцать (15) минут, не менее чем через двадцать (20) минут, не менее чем через тридцать (30) минут, не менее чем через сорок (40) минут, не менее чем через шестидесять (60) минут, не менее чем через один (1) час, не менее чем через 2 (два) часа, не менее чем через четыре (4) часа, не менее чем через шесть (6) часов, не менее чем через восемь (8) часов, не менее чем через десять (10) часов, не менее чем через двенадцать (12) часов, не менее чем через двадцать четыре (24) часа, не менее чем через два (2) дня, не менее чем через четыре (4) дня, не менее чем через шесть (6) дней, не менее чем через восемь (8) дней, не менее чем через десять (10) дней, не менее чем через двенадцать (12) дней, не менее чем через четырнадцать (14) дней, не менее чем через двадцать один (21) день или не менее чем через тридцать (30) дней после первого эффективного количества гетеродимерного Fc-слитого белка.

[0343] В некоторых вариантах осуществления один или оба из гетеродимерного Fc-слитого белка и/или дополнительного терапевтического средства вводят способом, выбранным из группы, состоящей из: внутривенного, подкожного, кожного, перорального, внутримышечного и внутрибрюшинного. В некоторых вариантах осуществления один или оба из гетеродимерного Fc-слитого белка и/или дополнительного терапевтического средства вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления перорально вводят один из гетеродимерного Fc-слитого белка и/или дополнительного терапевтического средства, или оба, или любую их комбинацию.

[0344] Специалисту в данной области техники понятно, что стандартные лекарственные формы настоящего раскрытия могут вводиться в одинаковых или разных физических формах, то есть перорально в виде капсул или таблеток и/или в виде жидкости посредством внутривенного вливания и так далее. Более того, стандартные лекарственные формы для каждого введения могут отличаться в зависимости от конкретного пути введения. Может существовать несколько различных лекарственных форм для одной или обеих комбинаций гетеродимерного Fc-слитого белка и дополнительных терапевтических средств. Поскольку разные медицинские состояния могут требовать разных путей введения, одни и те же

компоненты описанной в данном документе комбинации могут быть совершенно одинаковыми по составу и физической форме и, тем не менее, может потребоваться вводить разными способами и, возможно, в разное время для облегчения состояния. Например, такое состояние, как постоянная тошнота, особенно с рвотой, может затруднить использование пероральной лекарственной формы, и в таком случае может потребоваться введение другой стандартной лекарственной формы, возможно, даже такой же, как и другие лекарственные формы, который использовались ранее или позже, с ингаляционным, буккальным, сублингвальным путем или путем введения суппозиториев вместо или также. Конкретная лекарственная форма может потребоваться для определенных комбинаций гетеродимерного Fc-слитого белка и дополнительных терапевтических средств, поскольку могут возникнуть проблемы с различными факторами, такими как химическая стабильность или фармакокинетика.

NK-таргетная терапия

[0345] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с NK-таргетной терапией. Например, в одном из вариантов осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок вводят совместно с терапевтическим средством, направленно воздействующим на NKp46. В определенных вариантах осуществления изобретения терапевтическое средство, направленно воздействующее на NKp46, также связывает CD16, один или несколько антигенов, ассоциированных с опухолью, или их комбинацию. Типичные терапевтические средства, направленно воздействующие на NKp46, описаны более подробно в заявке США № US20170198038A1, включенной в данный документ в качестве ссылки для всех целей.

[0346] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с терапией с применением би- и триспецифических киллеров (BiKE и TriKE), включая терапию BiKE и TriKE, направленно воздействующую на NK-клетки. BiKE и TriKE сконструированы из одной тяжелой (VH) и легкой (VL) цепи вариабельной области каждого интересующего антитела. Домены VH и VL соединены коротким гибким полипептидным линкером для предотвращения диссоциации. BiKE и TriKE описаны более подробно в заявках США №№ US20180282386A1 и US20180258396A1, включенных в данный документ посредством ссылки для всех целей. BiKE и TriKE могут содержать связывающий домен, специфичный для NK-клетки.

[0347] В некоторых вариантах осуществления терапии BiKE и TriKE применяются в комбинации с терапией гетеродимерным Fc-слитым белком для лечения субъектов, у которых известен или подозревается миелодиспластический синдром высокого риска, острый миелогенный лейкоз, системный мастоцитоз или лейкоз тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в виде одного курса из 3 еженедельных блоков лечения. В некоторых вариантах осуществления блок лечения включает 4 последовательных 24-часовых непрерывных инфузии (приблизительно 96 часов) с последующим 72-часовым перерывом. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе 5 мкг/кг/день, 10 мкг/кг/день, 25 мкг/кг/день, 50 мкг/кг/день, 100 мкг/кг/день или 200 мкг/кг/ день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе по меньшей мере 5 мкг/кг/день, по меньшей мере 10 мкг/кг/день, по меньшей мере 25 мкг/кг/день, по меньшей мере 50 мкг/кг/день, по меньшей мере 100 мкг/кг/день или по меньшей мере 200 мкг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе по меньшей мере 1 мкг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе по меньшей мере 5 мкг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе по меньшей мере 200 мкг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе по меньшей мере 500 мкг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе по меньшей мере 1000 мкг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе 200 мкг/кг/день или менее. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе 500 мкг/кг/день или менее. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе 1000 мкг/кг/день или менее. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе от 1 до 200 мкг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе от 5 до 200 мкг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе от 1 до 500 мкг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе от 1 до 1000 мкг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе от 5 до 500 мкг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе от 5 до 1000 мкг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в максимально переносимой дозе. В некоторых вариантах осуществления BiKE и TriKE вводят в дозе, меньшей, чем максимально переносимая.

Терапия мультиспецифическим связывающим белком («TriNKET»)

[0348] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с терапией, включающей мультиспецифический связывающий белок, который включает: (a) первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; (b) второй антигенсвязывающий сайт, который связывает опухоль-ассоциированный антиген; и (c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16 («TriNKET») (например, мультиспецифические связывающие белки, содержащие различные связывающие NKG2D и опухоль-ассоциированные сайты связывания антигена, описанные в международной публикации № WO 2019/157332, содержание которой, относящееся к описанным в ней мультиспецифическим связывающим белкам, включено в настоящий документ посредством ссылки), для лечения субъектов, у которых известен или подозревается рак. Типичные опухоль-ассоциированные антигены включают, но не ограничиваются ими, HER2, CD20, CD33, антиген созревания B-клеток (BCMA), EpCAM, CD2, CD19, CD25, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, CLL1/CLEC12A, FLT3, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA HLA-E и PD-L1.

[0349] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с терапией, включающей дозу мультиспецифического связывающего белка в зависимости от массы тела. Например, дозы мультиспецифического связывающего белка в зависимости от массы тела составляют от около 0,01 мг до около 100 мг на кг массы тела, например от около 0,01 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, около 0,01 мкг до около 50 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 10 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 1 мкг/кг массы тела, от около 0,01 мкг до около 0,1 мкг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 10 мкг/кг массы тела, от около 0,1 мкг до около 1 мкг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 100 мг/кг масса тела, от около 1 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 1 мкг до около 50 мкг/кг массы тела, от около 1 мкг

до около 10 мкг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 10 мкг до около 50 мкг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 100 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 10 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 50 мкг до около 100 мкг/кг массы тела, от около 100 до около 100 мг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 50 мг/кг массы тела, от около 100 мкг до около 10 мг/кг массы тела, около 100 мкг до около 1 мг/кг массы тела, от около 1 мг до около 100 мг/кг массы тела, от около 1 мг до около 50 мг/кг массы тела, от около 1 мг до около 10 мг/кг массы тела, от около 10 мг до около 100 мг/кг массы тела, от около 10 мг до около 50 мг/кг массы тела, от около 50 мг до около 100 мг/кг массы тела.

[0350] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с терапией, включающей дозы мультиспецифического связывающего белка, вводимые один или несколько раз в день, еженедельно, ежемесячно или ежегодно или даже один раз каждые от 2 до 20 лет. Специалисты в данной области техники могут легко оценить частоту повторения дозирования на основании измеренных времен пребывания и концентраций целевой конструкции или комплекса в жидкостях или тканях организма.

Введение мультиспецифического связывающего белка может быть внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутриплевральным, интратекальным, внутриполостным, путем перфузии через катетер или путем прямой инъекции в очаг поражения. Его можно вводить один или несколько раз в день, один или несколько раз в неделю, один или несколько раз в месяц и один или несколько раз в год.

Терапия химерными антигенными рецепторами (CAR)

[0351] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с CAR-терапией. Термин «рецептор химерного антигена (chimeric antigen receptor)» или альтернативно «CAR» относится к рекомбинантной полипептидной конструкции, содержащей по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный

домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы (также называемый в данном документе как «первичный сигнальный домен»).

[0352] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий сайт, который связывает опухоль-ассоциированный антиген, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий первичный сигнальный домен. В определенных вариантах осуществления изобретения CAR дополнительно содержит один или несколько функциональных сигнальных доменов, происходящих от по меньшей мере одной костимулирующей молекулы (также называемой «костимулирующим сигнальным доменом»).

[0353] В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен (например, опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен scFv), содержащий вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи в качестве внеклеточного антигенсвязывающего домена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий первичный сигнальный домен. В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен (например, опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен scFv), содержащий вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи в качестве внеклеточного антигенсвязывающего домена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий сигнальный домен и первичный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен (например, опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен scFv), содержащий вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи в качестве внеклеточного антигенсвязывающего домена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий два костимулирующих сигнальных домена и первичный сигнальный домен. В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи в качестве внеклеточного антигенсвязывающего домена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий: по меньшей мере два костимулирующих сигнальных домена и первичный сигнальный домен.

[0354] Что касается трансмембранного домена, в различных вариантах осуществления CAR сконструирован так, чтобы содержать трансмембранный домен, который слит с внеклеточным доменом CAR. В одном варианте осуществления трансмембранный домен представляет собой домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или различных поверхностных мембранных белков, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. В другом варианте трансмембранный домен способен гомодимеризоваться с другим CAR на поверхности CAR T-клеток. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность трансмембранного домена может быть модифицирована или заменена так, чтобы минимизировать взаимодействия со связывающими доменами нативного связывающего партнера, присутствующего в той же CAR T-клетке.

[0355] Трансмембранный домен может происходить из любого природного мембраносвязанного или трансмембранного белка. В одном варианте осуществления трансмембранная область способна передавать сигнал внутриклеточному домену (доменам) всякий раз, когда CAR связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает трансмембранную область (области) одного или нескольких белков, выбранных из группы, состоящей из a-цепи TCR, b-цепи TCR, z-цепи TCR, CD28, CD3, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранную область (области) одного или нескольких белков, выбранных из группы, состоящей из KIRDS2, 0X40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R, IL2Ry, IL7Ra, ITGA1, VLA1, CD49 IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-l, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-l, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D и NKG2C.

[0356] Внеклеточный опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен (например, опухоль-ассоциированный антигенсвязывающий домен scFv) может быть связан с трансмембранным доменом посредством шарнирной области. Могут использоваться различные шарнирные области, включая, но не ограничиваясь ими, шарнир человеческого Ig (например, шарнир IgG4, шарнир IgD), линкер Gly-Ser, линкер $(G4S)_4$, шарнир KIR2DS2 и шарнир CD8α.

[0357] Внутриклеточный сигнальный домен CAR отвечает за активацию по меньшей мере одной из специализированных функций иммунной клетки (например, цитолитической активности или вспомогательной активности, включая секрецию цитокинов, Т-клетки), в которой CAR был помещен внутрь. Таким образом, используемый в данном документе термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка, которая трансдуцирует сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специальной функции. Хотя обычно может использоваться весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать всю цепочку. В той степени, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо интактной цепи до тех пор, пока она передает сигнал эффекторной функции. Термин внутриклеточный сигнальный домен, таким образом, означает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для трансдукции сигнала эффекторной функции.

[0358] Внутриклеточный сигнальный домен CAR включает первичный сигнальный домен (т. е. функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы) и один или несколько костимулирующих сигнальных доменов (т. е. функциональные сигнальные домены, производные по меньшей мере от одной костимулирующей молекулы).

[0359] Используемый в данном документе термин «стимулирующая молекула» относится к молекуле, экспрессируемой иммунной клеткой, например Т-клеткой, NK-клеткой или В-клеткой, которые обеспечивают цитоплазматическую сигнальную последовательность (последовательности), которые регулируют активацию иммунной клетки стимулирующим образом, по меньшей мере, для некоторых аспектов сигнального пути иммунных клеток. В одном варианте осуществления сигнал представляет собой первичный сигнал, который инициируется, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой MHC, нагруженной пептидом, и который приводит к опосредованию ответа Т-клеток, включая, но не ограничиваясь этим, пролиферацию, активацию, дифференциацию и т.п.

[0360] Первичные сигнальные домены, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как мотивы активации иммунорецепторного тирозина или ITAM. Примеры ITAM, содержащих цитоплазматические сигнальные последовательности, которые особенно используются в настоящем раскрытии, включают последовательности, полученные из CD3 дзета, общего FcR гамма (FCER1G), Fc гамма RIIa, FcR бета (Fc Epsilon R1b), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и DAP12. В одном варианте осуществления первичный сигнальный домен в любом одном или нескольких CAR содержит цитоплазматическую сигнальную последовательность, полученную из CD3-дзета.

[0361] В некоторых вариантах осуществления первичный сигнальный домен представляет собой функциональный сигнальный домен TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d, 4-1BB и/или CD3-дзета. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен CD3 дзета, общего FcR гамма (FCER1G), Fc гамма RIIa, FcR бета (Fc Epsilon Rlb), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и/или DAP12. В конкретном варианте первичный сигнальный домен представляет собой функциональный сигнальный домен дзета-цепи, связанный с рецепторным комплексом Т-клеток.

[0362] Используемый в данном документе термин «костимулирующая молекула» относится к родственному партнеру связывания на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, но не ограничиваясь этим, пролиферация. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличную от рецептора антигена или его лигандов, которая необходима для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), 0X40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1, CD11a/CD18), CD2, CD7, CD258 (LIGHT), NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т.п. Дополнительные примеры таких костимулирующих молекул включают CD5, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8альфа, CD8бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4),

CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD 100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp и лиганд, который специфически связывается с CD83. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен CAR представляет собой функциональный сигнальный домен костимулирующей молекулы, описанной в данном документе, например, 0X40, CD27, CD28, CD30, CD40, PD-1, CD2, CD7, CD258, NKG2C, B7-H3, лиганд, который связывается с CD83, ICAM-1, LFA-1 (CD1a/CD18), ICOS и 4-1BB (CD137), или любую их комбинацию.

[0363] Используемый в данном документе термин «сигнальный домен» относится к функциональной части белка, который действует путем передачи информации внутри клетки, регулируя клеточную активность через определенные сигнальные пути, генерируя вторичные мессенджеры или действуя как эффекторы, отвечая на такие мессенджеры.

[0364] Цитоплазматические сигнальные последовательности в цитоплазматической сигнальной части CAR могут быть связаны друг с другом в случайном или заданном порядке. Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от 2 до 10 аминокислот, может образовывать связь.

Терапия антителами

[0365] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапию гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируют с терапией антителами для лечения субъектов, у которых известен или подозревается рак.

[0366] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок комбинируют с терапией, содержащей анти-HER2-связывающий домен, такой как анти-HER2-антитело или платформы анти-HER2-антител (например, биспецифическое или триспецифическое антитело, содержащее анти-HER2-связывающий домен, конъюгаты антитела против HER2 с лекарственным средством или CAR против HER2). Антитела против HER2 включают, но не ограничиваются ими, трастузумаб (HERCEPTIN® - Roche/Genentech; Kanjinti-Amgen), пертузумаб (PERJETA® -Roche/Genentech) и MGAH22 (подробно описанный в патенте США № 8,802,093, в данный документ включены посредством ссылки для всех целей). Платформы антител против HER2 включают, но без ограничения, эртумаксомаб (REXOMUN® - Creative Biolabs) и трастузумаб эмтанзин (адо-

трастузумаб эмтанзин/T-DM1; KADCYLA® - Roche/Genentech). В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом используют в комбинации с терапией гетеродимерным Fc-слитым белком для лечения субъектов, у которых известен или подозревается рак. В определенных вариантах осуществления изобретения терапию анти-HER2-связывающим доменом проводят путем внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в дозе 1 мг/кг/день, 2 мг/кг/день, 3 мг/кг/день, 4 мг/кг/день, 5 мг/кг/день, 6 мг/кг/день, 7 мг/кг/день, 8 мг/кг/день, 9 мг/кг/день, 10 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в дозе по меньшей мере 1 мг/кг/день, по меньшей мере 2 мг/кг/день, по меньшей мере 3 мг/кг/день, по меньшей мере 4 мг/кг/день, по меньшей мере 5 мг/кг/день, по меньшей мере 6 мг/кг/день, по меньшей мере 7 мг/кг/день, по меньшей мере 8 мг/кг/день, по меньшей мере 9 мг/кг/день, по меньшей мере 10 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в дозе менее 1 мг/кг/день.

[0367] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапию анти-HER2-связывающим доменом применяют в комбинации с терапией гетеродимерным Fc-слитым белком для лечения субъектов, у которых известен или подозревается рак груди, например субъекта, у которого диагностирован нетастатический рак молочной железы с гиперэкспрессией HER2. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в дозе 4 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в дозе 4 мг/кг/день путем внутривенной инфузии в течение 90 минут. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в дозе 2 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в дозе 2 мг/кг/день путем внутривенной инфузии в течение 30 минут. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в начальной дозе 4 мг/кг/день и затем вводят еженедельно в дозе 2 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в начальной дозе 4 мг/кг/день и затем вводят еженедельно в дозе 2 мг/кг/день в течение 52 недель.

[0368] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапию анти-HER2-связывающим доменом применяют в сочетании с терапией гетеродимерным Fc-слитым белком для лечения субъектов, у которых известен или подозревается рак желудка,

например субъекта, у которого диагностирован метастатический рак желудка с гиперэкспрессией HER2. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в дозе 8 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в дозе 8 мг/кг/день путем внутривенной инфузии в течение 90 минут. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в дозе 6 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в дозе 6 мг/кг/день путем внутривенной инфузии в течение от 30 до 90 минут. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в начальной дозе 8 мг/кг/день и затем вводят еженедельно в дозе 6 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-HER2-связывающим доменом вводят в начальной дозе 8 мг/кг/день и затем вводят еженедельно в дозе 6 мг/кг/день в течение 52 недель.

[0369] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с терапией, содержащей анти-CD20-связывающий домен, такой как анти-CD20-антитело или платформы анти-CD20-антител (например, биспецифическое или триспецифическое антитело, содержащее связывающий домен анти-CD20, конъюгаты анти-CD20-антитело-лекарственное средство или анти-CD20-CAR). Антитела к CD20 включают, но не ограничиваются ими, ритуксимаб (RITUXAN® - Roche/Genentech), окрелизумаб (OCREVUS® - Roche/Genentech), обинутузумаб (GAZYVA® - Roche/Genentech), офатумумаб (ARZERRA® - Novartis) и велтузумаб. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом применяют в сочетании с терапией гетеродимерным Fc-слитым белком для лечения субъектов, у которых известен или подозревается рак. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом проводят путем внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом вводят в дозе 100 мг/м^2, 200 мг/м^2, 300 мг/м^2, 400 мг/м^2, 500 мг/м^2, 600 мг/м^2, 700 мг/м^2, 800 мг/м^2, 900 мг/м^2 или 1000 мг/м^2. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом вводят в дозе 375 мг/м^2. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом вводят в дозе по меньшей мере 100 мг/м^2, по меньшей мере 200 мг/м^2, по меньшей мере 300 мг/м^2, по меньшей мере 400 мг/м^2, по меньшей мере 500 мг/м^2, по меньшей мере 600 мг/м^2, по меньшей мере 700 мг/м^2, по меньшей мере 800 мг/м^2, по

меньшей мере 900 мг/м^2 или по меньшей мере 1000 мг/м^2. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом вводят в дозе менее 400 мг/м^2. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом вводят в дозе менее 375 мг/м^2.

[0370] В некоторых вариантах осуществления терапия анти-CD20-связывающим доменом применяется в комбинации с терапией гетеродимерным Fc-слитым белком для лечения субъектов, у которых известно или подозревается наличие неходжкинской лимфомы (NHL). В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом вводят в дозе 375 мг/м^2 путем внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом вводят в дозе менее 375 мг/м^2 путем внутривенной инфузии.

[0371] В некоторых вариантах осуществления терапия анти-CD20-связывающим доменом применяется в комбинации с терапией гетеродимерным Fc-слитым белком для лечения субъектов, у которых известен или подозревается хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом вводят в дозе 375 мг/м^2 путем внутривенной инфузии в первом цикле и в дозе 500 мг/м^2 путем внутривенной инфузии за цикл в дополнительных от 2 до 6 циклах. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом вводят в дозе менее 375 мг/м^2 путем внутривенной инфузии. Комбинированная терапия анти-CD20-связывающим доменом и гетеродимерным Fc-слитым белком может применяться в комбинации с флударабином и циклофосфамидом (FC).

[0372] В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом применяют в комбинации с терапией гетеродимерным Fc-слитым белком для лечения субъектов, у которых известен или подозревается ревматоидный артрит (RA). В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом вводят двумя дозами по 1000 мг, разделенными на 2 недели, путем внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления терапию анти-CD20-связывающим доменом вводят двумя дозами по 1000 мг, разделенными на 2 недели, путем внутривенной инфузии до 24 недель. В некоторых вариантах осуществления комбинированную терапию с использованием комбинированного анти-CD20-связывающего домена и гетеродимерного Fc-слитого белка проводят совместно с метотрексатом.

[0373] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с терапией, включающей терапию антителами, содержащими агонистические антитела. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело представляет собой антитело против 4-1BB, антитело против CD137, антитело против FAP, антитело против OX40, антитело против CD40, антитело против GITR или антитело против CD27. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело представляет собой биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело, например, биспецифическое антитело, содержащее два или более антигенсвязывающих домена, выбранное из антитела против 4-1BB, антитела против CD137, антитела против FAP, антитела против OX40, антитела против CD40, антитела против GITR или антитела против CD27. Показательным примером является биспецифическое агонистическое антитело, направленно воздействующее на 4-1BB и CD137, такое как утомилумаб (Pfizer).

Терапия ингибиторами контрольных точек

[0374] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком может быть объединена с терапией ингибитором контрольных точек. Иллюстративные молекулы иммунных контрольных точек, которые могут быть нацелены на блокирование или ингибирование, включают, но не ограничиваются ими, CTLA-4, 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4 (принадлежит к семейству молекул CD2 и экспрессируется на всех NK, gd и CD8+ (ab) Т-клетках памяти), CD160 (также обозначаемый как BY55) и CGEN-15049. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или другие связывающие белки, которые связываются и блокируют или ингибируют активность одного или нескольких CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160 и CGEN-15049. Иллюстративные ингибиторы иммунных контрольных точек включают иллюстративные ингибиторы иммунных контрольных точек, включая ниволумамб (анти-PD-1; OPDIVO® - BMS), AMP224 (анти-PD-1; NCI), пембролизумаб (анти-PD-1; MK-3475/KEYTRUDA® - Merck), пидилизумаб (антитело против PD-1; CT-011 - Teva/CureTech), атезолизумаб (анти-PD-L1; TECENTRIQ® -Roche/Genentech), дурвалумаб (анти-PD-L1; MEDI4736/IMFINZI® - Medimmune/AstraZeneca), авелумаб (анти-PD-L1;

BAVENCIO® - Pfizer), BMS-936559 (анти-PD-L1 - BMS), ипилимумаб (антитело-CTLA-4; YERVOY® - BMS), тремелимумаб (анти-CTLA-4; Medimmune/AstraZeneca), лирилумаб (анти-KIR; BMS), монализумаб (анти-NKG2A; Innate Pharma/AstraZeneca), BY55 (анти-CD160), анти-OX40, анти-TIM3 и анти-LAG3.

[0375] В некоторых вариантах осуществления терапию ингибитором контрольных точек применяют в сочетании с терапией гетеродимерным Fc-слитым белком для лечения субъектов, у которых известен или подозревается рак. В некоторых вариантах осуществления терапию ингибитором контрольных точек вводят путем внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления терапию ингибитором контрольных точек вводят путем внутривенной инфузии в течение 30 минут. В некоторых вариантах осуществления терапию ингибитором контрольных точек проводят каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления терапию ингибитором контрольных точек вводят в дозе 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг или 1000 мг. В некоторых вариантах осуществления терапию ингибитором контрольных точек вводят в дозе 200 мг. В некоторых вариантах осуществления терапию ингибитором контрольных точек вводят в дозе по меньшей мере 100 мг, по меньшей мере 200 мг, по меньшей мере 300 мг, по меньшей мере 400 мг, по меньшей мере 500 мг, по меньшей мере 600 мг, по меньшей мере 700 мг, по меньшей мере 800 мг, по меньшей мере 900 мг или по меньшей мере 1000 мг. В некоторых вариантах осуществления терапию ингибитором контрольных точек вводят в дозе менее 200 мг. В некоторых вариантах осуществления терапия ингибитором контрольных точек применяется в сочетании с терапией гетеродимерным Fc-слитым белком для лечения субъектов, у которых известно или подозревается наличие меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), классической лимфомы Ходжкина (cHL), первичной крупноклеточной В-лимфомы средостения (PMBCL), уротелиальной карциномы, рака с высоким уровнем микросателлитной нестабильности, рака желудка, рака шейки матки, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), карциномы клеток Меркеля (MCC), почечно-клеточной карциномы (RCC).

Дополнительная цитокиновая терапия

[0376] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с одной или несколькими дополнительными терапиями цитокинами, одной

или несколькими терапиями хемокинами или их комбинациями. В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с одной или несколькими дополнительными терапиями цитокинами. В некоторых вариантах осуществления терапию гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируют с одним или несколькими видами лечения хемокинами. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая терапия включает провоспалительный цитокин, цитокин Th1 или цитокин Th2. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая терапия включает рекомбинантный человеческий цитокин или хемокин.

[0377] В некоторых вариантах осуществления цитокиновая терапия включает цитокин, который представляет собой интерлейкин (например, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21 и IL-22). В некоторых вариантах осуществления цитокиновая терапия включает цитокин, который является фактором роста (например, фактор некроза опухоли (TNF), LT, EMAP-II, GM-CSF, FGF и PDGF). В некоторых вариантах осуществления цитокиновая терапия включает противовоспалительный цитокин (например, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 и TGF).

[0378] В некоторых вариантах осуществления хемокиновая терапия включает провоспалительный хемокин (например, GRO-a, GRO-b, LIX, GCP-2, MIG, IP10, 1-TAC и MCP-1, RANTES, эотаксин, SDF-1 и MIP3a). В некоторых вариантах осуществления хемокиновая терапия включает хемокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления хемокиновая терапия включает хемокиновый рецептор CXC (например, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6 и CXCR7), хемокиновый рецептор CC (например, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 и CCR11), хемокиновый рецептор CX3C (например, CX3C11) или XC хемокиновый рецептор (например, XCR1). В некоторых вариантах осуществления хемокиновая терапия включает трансмембранный рецептор, связанный с G-белком.

[0379] В некоторых вариантах осуществления цитокиновая терапия включает цитокиновую терапию, которая синергетична с передачей сигналов IL-12. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая терапия включает цитокин IL-2 или его производное. В некоторых вариантах осуществления для лечения IL-2 используется альдеслейкин (Proleukin - Prometheus Therapeutics). В некоторых вариантах осуществления терапия с использованием IL-2 и/или альдеслейкина вводится внутривенно. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая терапия включает цитокин IL-15 или его производное. В

некоторых вариантах осуществления терапия с использованием IL-15 представляет собой ALT-803 (Altor Bioscience) или NKTR-255 (Nektar). В некоторых вариантах осуществления терапия с использованием IL-15, NKTR-255 и/или ALT-803 вводится подкожно. В некоторых вариантах осуществления хемокиновая терапия включает хемокин CXCL9, хемокин CXCL10 или их производные.

[0380] В некоторых вариантах осуществления цитокиновая или хемокиновая терапия включает введение субъекту цитокина или хемокина. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая или хемокиновая терапия включает введение субъекту рекомбинантного цитокина или хемокина. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая или хемокиновая терапия включает конструирование клетки для продуцирования цитокина или хемокина. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая или хемокиновая терапия включает конструирование клетки *ex vivo*, in vitro или *in vivo* для продуцирования цитокина или хемокина.

[0381] В некоторых вариантах осуществления цитокиновая или хемокиновая терапия включает конструирование клетки для продуцирования цитокина или хемокина с использованием платформы доставки на основе вирусного вектора, такой как коровья оспа, оспа птиц, самореплицирующийся альфавирус, марабавирус, аденовирус (см., например, Tatsis *et al.*, Adenoviruses, Molecular Therapy (2004) 10, 616-629), лентивирус, включая, помимо прочего, лентивирус второго, третьего или гибридного второго/третьего поколения и рекомбинантный лентивирус любого поколения, предназначенный для нацеливания на определенные типы клеток или рецепторы (см., например, Hu *et al.*, Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, Immunol Rev. (2011) 239 (1): 45-61, Sakuma *et al.*, Lentiviral vectors: basic to translational, Biochem J. (2012) 443(3):603-18, Cooper *et al.*, Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter, Nucl. Acids Res. (2015) 43 (1): 682-690, Zufferey *et al.*, Self-Inactivating Lentivirus Vector for SaFc and Efficient In Vivo Gene Delivery, J. Virol. (1998) 72 (12): 9873-9880) или вектор аденоассоциированного вируса («AAV»), как более подробно описано в патентах США №№ 5,173,414; Tratschin *et al.,* Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al, Mol. Cell, Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:64666470 (1984); and Samuiski et al, J. Virol. 63:03822-3828 (1989)). В некоторых вариантах осуществления цитокиновая или хемокиновая терапия включает конструирование клетки для производства цитокина или хемокина с использованием LNP,

липосомы или экзосомы. В некоторых вариантах осуществления цитокиновая или хемокиновая терапия включает конструирование клетки для продуцирования цитокина или хемокина с использованием редактирования генома, например, с использованием основанных на нуклеазах систем редактирования генома (например, семейство кластерных коротких палиндромных повторов с регулярными промежутками (CRISPR), эффекторная нуклеаза, подобная активатору транскрипции (TALEN), нуклеаза цинкового пальца (ZFN) и система редактирования генома на основе самонаводящейся эндонуклеазы (HE) или ее производное). В некоторых вариантах осуществления цитокиновая или хемокиновая терапия включает конструирование клетки для продуцирования цитокина или хемокина с использованием электропорации.

Терапия агонистами врожденной иммунной системы

[0382] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с одним или несколькими агонистами врожденной иммунной системы.

[0383] В некоторых вариантах осуществления агонист врожденной иммунной системы включает агонист толл-подобного рецептора (TLR). В некоторых вариантах осуществления агонист TLR включает агонист TLR1/2, TLR2/6, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR7/8 или TLR9. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR2/6 включает липопротеины, такие как бактериальные липопротеины или производные, такие как Pam2CSK4. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR1/2 содержит липопротеины. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR3 включает аналог дцРНК, такой как ринтатолимод (AMPLIGEN® - Hemispherx Biopharma) или поли IC-LC (например, HILTONOL®). В некоторых вариантах осуществления агонист TLR4 включает липополисахарид (LPS, также называемый эндотоксином) или производные, такие как липид А. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR7 содержит оцРНК или производные или производные имидазохинолина, включая, но не ограничиваясь, резиквимод (также упоминается как R848), имиквимод (ZYCLARA®, Aldara - Medicis) и гардиквимод. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR7 также является агонистом TLR8, таким как имиквимод или Medi-9197 (AstraZeneca/Medimmune). В некоторых вариантах осуществления агонист TLR9 включает CpG-содержащий олигодезоксинуклеотид (CpG-ODN) или SD-101 (Dynavax).

[0384] В некоторых вариантах осуществления агонист врожденной иммунной системы включает агонист стимулятора генов интерферона (STING). В некоторых вариантах

осуществления агонист STING включает циклический динуклеотид (CDN). В некоторых вариантах осуществления CDN содержит циклический ди-AMP, циклический ди-GMP или циклический GMP-AMP (cGAMP). В некоторых вариантах осуществления агонист STING включает нуклеиновую кислоту (например, ДНК или РНК), которая стимулирует cGAS. В некоторых вариантах осуществления агонист STING представляет собой ADU-S100 (также называемый MIW815 - Aduro/Novartis).

Химиотерапия

[0385] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с одной или несколькими видами химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с одним или несколькими видами химиотерапии для лечения субъекта, у которого диагностирован рак. Примеры химиотерапевтических средств включают альдеслейкин, альвоцидиб, антинеопластон AS2-1, антинеопластон A10, антитимоцитарный глобулин, тригидрат амифостина, аминокамптотецин, триоксид мышьяка, бета-алетин, ингибитор белков семейства Bcl-2 ABT-263, ABT-199, BMS-345541, бортезомиб (VELCADE®), бриостатин 1, бусульфан, карбоплатин, кампат-1H, CC-5103, кармустин, каспофунгин ацетат, клофарабин, цисплатин, кладрибин (LEUSTARIN®), хлорамбуцил (LEUKERAN®), куркумин, циклоспорин, циклофосфамид (Cyloxan, Endoxan, Endoxana, Cyclostin), цитарабин, денилейкин дифтитокс, дексаметазон, DT PACE, доцетаксел, доластатин 10, доксорубицин (АДРИАМИЦИН®, АДРИБЛАСТИН®), доксорубицина гидрохлорид, энзастаурин, эпоэтин альфа, этопозид, эверолимус (RAD001), фенретинид, филграстим, мелфалан, месна, флавопиридол, флударабин (FLUDARA®), гелданамицин (17-AAG), ифосфамид, иринотекана гидрохлорид, иксабепилон, леналидомид (REVLIMID®, CC-5013), лимфокин-активированные клетки-киллеры, мелтексфалан, метотрексона гидрохлорид, метотрексона, митотрексона, галогенидмохлоргидроксон, неларабин, облимерсен (GENASENSE®), обатоклакс (GX15-070), облимерсен, октреотида ацетат, омега-3 жирные кислоты, оксалиплатин, паклитаксел, PD0332991, ПЭГилированный липосомальный доксорубицин гидрохлорид, пегнисентиментиментиминстаграсон, пегнисентстграсон, R-росковитин (SELICILIB®, CYC202), рекомбинантный интерферон альфа, рекомбинантный интерлейкин-12, рекомбинантный интерлейкин-11, рекомбинантный лиганд flt3, рекомбинантный человеческий тромбопоэтин, ритуксимаб, сарграмостим,

силденафилцитрат, симолимусфоны, стиролимулатин, стиролимуластон, танеспимицин, темсиролимус (CC1-779), талидомид, терапевтические аллогенные лимфоциты, тиотепа, типифамиб, VELCADE® (BORTEZOMIB® или PS-341), винкристин (ONCOVIN®), винкристина сульфат, винорелбина дитартрат, Vorinostat (SAHA) и FR (флударабин, ритуксимаб), CHOP (циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизон), CVP (циклофосфамид, винкристин и преднизон), FCM (флударабин, циклофосфамид, митоксантрон), FCR (флударабин, циклофосфамид, ритуксимаб), hyperCVAD (гиперфракционированный циклофосфамид, винкристин, доксорубицин, дексаметазон, метотрексат, цитарабин), ICE (ифосфамид, карбоплатин и этопозид), MCP (митоксантрон, хлорамбуцил и преднизолон), R-CHOP (ритуксимаб плюс CHOP), R-CVP (ритуксимаб плюс CVP), R-FCM (ритуксимаб плюс FCM), R-ICE (ритуксимаб-ICE) и R-MCP (R-MCP).

[0386] В некоторых вариантах осуществления терапию гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируют с одним или несколькими химиотерапиями для лечения субъекта, у которого диагностирован рак толстой кишки, рак прямой кишки или колоректальный рак (CRC). В некоторых вариантах осуществления химиотерапия включает FOLFOX (5-FU, лейковорин и оксалиплатин/элоксатин), FOLFIRI (лейковорин, 5-FU и иринотекан/камптозар), FOLFOXIRI (лейковорин, 5-FU, оксалиплатин и иринотекан), (капецитабин и оксалиплатин), 5-ФУ совместно с лейковорином, капецитабин (XELODA®) отдельно или трифлуридин и типирацил (LONSURF®). В некоторых вариантах осуществления химиотерапия включает средство нацеливания на VEGF, такое как бевацизумаб (AVASTIN®), зив-афлиберцепт (ZALTRAP®), рамуцирумаб (CYRAMZA®) или регорафениб (STIVARGA®), или средство нацеливания на EGFR, такое как цетуксимаб (ERBITUX) или панитумумаб (VECTIBIX®). В некоторых вариантах осуществления химиотерапию проводят совместно с химиотерапией, выбранной из FOLFOX, FOLFIRI, FOLFOXIRI, CapeOx, 5-FU совместно с лейковорином, только капецитабин и трифлуридин/типирацил вместе со средством направленного действия на VEGF или средством направленного действия на EGFR.

[0387] В некоторых вариантах осуществления терапию гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируют с одним или несколькими химиотерапиями для лечения субъекта, у которого диагностирован рак груди. В некоторых вариантах осуществления химиотерапия включает доксорубицин (ADRIAMYCIN®), пегилированный липосомальный доксорубицин, эпирубицин (ELLENCE®), паклитаксел (Taxol), доцетаксел (TAXOTERE®), связанный с

альбумином паклитаксел (ABRAXANE®), 5-фторурацил (5-FU), циклофосфамид (CYTOXAN®), карбоплатин (PARAPLATIN®), цисплатин, винорелбин (NAVELBINE®), капецитабин (XemcODA) ГЕМЗАР®), иксабепилон (IXEMPRA®) или эрибулин (HALAVEN). В некоторых вариантах осуществления химиотерапия включает комбинацию двух или более химиотерапевтических препаратов, выбранных из доксорубицина (ADRIAMYCIN®), пегилированного липосомального доксорубицина, эпирубицина (ELLENCE®), паклитаксела (Taxol), доцетаксела (TAXOTERE®), паклитаксела, связанного с альбумином (ABRAXANE®), 5-фторурацила (5-FUTOX) карбоплатина (PARAPLATIN®), цисплатина, винорелбина (NAVELBINE®), капецитабина (XELODA®), гемцитабина (GEMZAR®), иксабепилона (IXEMPRA®) и эрибулина (HALAVEN®).

[0388] В некоторых вариантах осуществления терапию гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируют с одним или несколькими видами химиотерапии для лечения субъекта, у которого диагностирована меланома/рак кожи. В некоторых вариантах осуществления химиотерапия включает дакарбазин (также называемый DTIC), темозоломид, наб-паклитаксел, паклитаксел, цисплатин, карбоплатин или винбластин.

Терапия средствами направленного действия

[0389] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с одним или несколькими средствами направленного действия. В общем, средства направленного действия действуют на определенные молекулярные мишени, такие как мишени, связанные с раком. Средства направленного действия отличаются от стандартных химиотерапевтических средств тем, что стандартные химиотерапевтические препараты действуют на все быстро делящиеся нормальные и раковые клетки. Средства направленного действия включают, но не ограничиваются ими, гормональную терапию, ингибитор передачи сигнала, модулятор экспрессии гена, индуктор апоптоза, ингибитор ангиогенеза, иммунотерапию, молекулу доставки токсина (например, конъюгат антитела с лекарственным средством) и ингибитор киназы. В некоторых вариантах осуществления средство направленного действия включает агонист рецептора или лиганд.

[0390] В некоторых вариантах осуществления терапию гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируют с одним или несколькими средствами направленного действия для лечения субъекта, у которого диагностирован рак толстой кишки, рак прямой кишки или колоректальный рак (CRC). В некоторых вариантах осуществления средство направленного

действия включает цетуксимаб (ERBITUX®), панитумумаб (VECTIBIX®), бевацизумаб (AVASTIN®), зив-афлиберцепт (ZALTRAP®), регорафениб (STIVARGA®), рамуцирумаб (CYRAMZA®), ниволумаб (OPDIVO®) или ипилимумаб (YERVOY®).

[0391] В некоторых вариантах осуществления терапию гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируют с одним или несколькими средствами направленного действия для лечения субъекта, у которого диагностирован рак груди. В некоторых вариантах осуществления средство направленного действия включает эверолимус (AFINITOR®), тамоксифен (NOLVADEX®), торемифен (FARESTON®), трастузумаб (HERCEPTIN®), фульвестрант (FASLODEX®), анастрозол (ARIMIDEX®), экземестан (AROMASIN®), лапатиниб (TYKERB®), летрозол (FEMARETA®), летрозол (FEMARA®), пертузумаб (PERJETA®), адо-трастузумаб эмтансин (KADCYLA®), палбоциклиб (IBRANCE®), рибоциклиб (KISQALI®), малеат нератиниба (NERLYNX™), абемациклиб (VERZENIO™), олапариб (LYNPARZA™), атезолизумаб (TECENTRIQ®) или альпелисиб (PIQRAY®).

[0392] В некоторых вариантах осуществления терапию гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируют с одним или несколькими средствами направленного действия для лечения субъекта, у которого диагностирована меланома/рак кожи. В некоторых вариантах осуществления средство направленного действия включает висмодегиб (ERIVEDGE®), сонидегиб (ODOMZO®), ипилимумаб (YERVOY®), вемурафениб (ZELBORAF®), траметиниб (MEKINIST®), дабрафениб (TAFINLAR®), пембролизумаб (KEYTRUDA®), ниволумаб (OPDIVO®), кобиметиниб (COTELLIC™), алитретиноин (PANRETIN®), авелумаб (BAVENCIO®), энкорафениб (BRAFTOVI™), биниметиниб (MEKTOVI®) или цемиплимаб-rwlc (LIBTAYO®).

[0393] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с терапией агонистом рецептора или лигандом. В некоторых вариантах осуществления терапия агонистом рецептора или лигандом включает агонистическое антитело. В некоторых вариантах осуществления терапия агонистом рецептора или лигандом включает лиганд рецептора, такой как 4-1BBL или CD40L.

Лучевая терапия

[0394] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с лучевой терапией. В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с радиоизотопными частицами, такими

как индий индий In-111, иттрий Y-90 или йод I-131. Примеры комбинированной терапии включают, но не ограничиваются ими, тозитумомаб йод I-131 (BEXXAR®), иттрий-90 ибритумомаб тиуксетан (ZEVALIN®) и BEXXAR® с **CHOP**. В некоторых вариантах осуществления лучевая терапия включает внешнюю лучевую терапию (**EBRT**), внутреннюю лучевую терапию (брахитерапию), внутриполостную лучевую терапию, интерстициальную брахитерапию, радиоэмболизацию, гипофракционированную лучевую терапию, интраоперационную лучевую терапию (**IORT**), 3D-конформную радиотерапию, стереотаксическую радиохирургию (**SRS**) или стереотаксическую лучевую терапию тела (**SBRT**).

[0395] В некоторых вариантах осуществления терапию гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируют с одной или несколькими лучевыми терапиями для лечения субъекта, у которого диагностирован рак толстой кишки, рак прямой кишки или колоректальный рак (CRC). В некоторых вариантах осуществления лучевая терапия включает внешнюю лучевую терапию (EBRT), внутреннюю лучевую терапию (брахитерапию), внутриполостную лучевую терапию, интерстициальную брахитерапию или радиоэмболизацию.

[0396] В некоторых вариантах осуществления терапию гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируют с одним или несколькими видами радиотерапии для лечения субъекта, у которого диагностирован рак груди. В некоторых вариантах осуществления лучевая терапия включает лучевую терапию с использованием внешнего луча, гипофракционированную лучевую терапию, интраоперационную лучевую терапию (IORT) или 3D-конформную лучевую терапию.

[0397] В некоторых вариантах осуществления терапию гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируют с одним или несколькими лучевыми способами лечения для лечения субъекта, у которого диагностирована меланома/рак кожи. В некоторых вариантах осуществления лучевая терапия включает стереотаксическую радиохирургию (SRS; например, с использованием гамма-ножа или линейного ускорителя) или стереотаксическую лучевую терапию тела (SBRT).

Вакцинная терапия и терапия онколитическими вирусами

[0398] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с одной или несколькими иммуногенными композициями, например,

вакцинной композицией или онколитическим вирусом, способными вызывать специфический иммунный ответ, например, опухолеспецифический иммунный ответ.

[0399] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с вакцинной композицией. Вакцинные композиции обычно содержат множество антигенов и/или неоантигенов, специфичных для целевой опухоли. Вакцинные композиции также могут называться вакцинами.

[0400] В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция дополнительно содержит адъювант и/или носитель. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция связывается с носителем, таким как белок, или антигенпрезентирующей клеткой, такой как дендритная клетка (DC), способная представлять пептид Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления носители представляют собой каркасные структуры, например полипептид или полисахарид, с которыми способен связываться антиген или неоантиген.

[0401] Обычно адъюванты представляют собой любое вещество, добавление которого в композицию вакцины увеличивает или иным образом изменяет иммунный ответ на антиген или неоантиген. Необязательно адъюванты конъюгированы ковалентно или нековалентно. Способность адъюванта усиливать иммунный ответ на антиген обычно проявляется в значительном или существенном усилении иммуноопосредованной реакции или уменьшении симптомов заболевания. Например, повышение гуморального иммунитета обычно проявляется значительным увеличением титра антител к антигену, и повышение активности Т-клеток обычно проявляется в повышенной пролиферации клеток, клеточной цитотоксичности или секреции цитокинов. Адъювант также может изменять иммунный ответ, например, изменяя преимущественно гуморальный или Th-ответ на преимущественно клеточный или Th-ответ. Подходящие адъюванты включают, но не ограничиваются ими, 1018 ISS, квасцы, соли алюминия, Amplivax, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod, ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, монофосфорил липид A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, векторную систему PepTel, микрочастицы PLG, резиквимод, SRL172, виросомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, ловушку VEGF, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимул QS21 Aquila (Aquila Biotech, Worcester, Mass., USA), который получают из сапонина, экстракты микобактерий и синтетические имитаторы бактериальных клеточных

стенок, а также другие запатентованные адъюванты, такие как Ribi's Detox. Quil или Superfos. Применимы такие адъюванты, как неполный Фрейнда или GM-CSF. Некоторые иммунологические адъюванты (например, MF59), специфичные для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее (Dupuis M, et al, Cell Immunol. 1998; 186(1): 18-27; Allison A C; Dev Biol Stand. 1998; 92:3-11). Также можно использовать цитокины. Некоторые цитокины напрямую связаны с влиянием на миграцию дендритных клеток в лимфоидные ткани (например, TNF-альфа), ускоряя созревание дендритных клеток в эффективные антигенпрезентирующие клетки для Т-лимфоцитов (например, GM-CSF, IL-1 и IL-4) (патент США № 5,849,589, конкретно включенный в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте), и действуют как иммуноадъюванты (например, IL-12) (Gabrilovich D I, et al, J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6):414-418). В некоторых вариантах осуществления адъювант содержит иммуностимулирующий CpG олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления адъювант содержит агонист TLR.

[0402] Другие примеры применимых адъювантов включают, но не ограничиваются ими, химически модифицированные CpG (например, CpR, Idera), Poly (I:C) (например, polyi:CI2U), не-CpG бактериальную ДНК или РНК, а также иммуноактивные небольшие молекулы и антитела, такие как циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб, целебрекс, NCX-4016, силденафил, тадалафил, варденафил, сорафмиб, XL-999, CP-547632, пазопаниб, ZD2171, AZD2171, ипилимумаб, тремелимумаб и SC58175, которые могут действовать терапевтически и/или в качестве адъюванта. Количества и концентрации адъювантов и добавок может легко определить квалифицированный специалист без излишнего экспериментирования. Дополнительные адъюванты включают колониестимулирующие факторы, такие как фактор, стимулирующий колонии макрофагов гранулоцитов (GM-CSF, сарграмостим).

[0403] В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция содержит более одного другого адъюванта. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция содержит любое адъювантное вещество, включая любое из вышеперечисленных или их комбинации. Также предполагается, что вакцину и адъювант можно вводить вместе или по отдельности в любой подходящей последовательности.

[0404] В некоторых вариантах осуществления носитель (или вспомогательное вещество) присутствует независимо от адъюванта. В некоторых вариантах осуществления функция носителя заключается в увеличении молекулярной массы, повышении активности или

иммуногенности, обеспечении стабильности, повышении биологической активности или увеличении периода полужизни в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления носитель помогает презентировать пептиды Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления носитель включает любой подходящий носитель, известный специалисту в данной области техники, например белок или антигенпрезентирующую клетку. Примеры белков-носителей включают, но не ограничиваются ими, гемоцианин лимфы улитки, белки сыворотки, такие как трансферрин, бычий сывороточный альбумин, человеческий сывороточный альбумин, тиреоглобулин или овальбумин, иммуноглобулины или гормоны, такие как инсулин или пальмитиновая кислота. Для иммунизации людей носитель обычно представляет собой физиологически приемлемый носитель, приемлемый для человека и безопасный. Однако подходящими носителями являются столбнячный анатоксин и/или дифтерийный анатоксин. В качестве альтернативы, носителем могут быть декстраны, например сефароза.

[0405] В некоторых вариантах осуществления вакцина включает платформу вакцины на основе вирусного вектора, такую как вакцина, оспа птиц, самореплицирующийся альфавирус, марабавирус, аденовирус (см., например, Tatsis et al., Adenoviruses, *Molecular Therapy* (2004) 10, 616-629) или лентивирус, включая, помимо прочего, лентивирус второго, третьего или гибридного второго/третьего поколения и рекомбинантный лентивирус любого поколения, предназначенный для нацеливания на определенные типы клеток или рецепторы (см., например, Hu et al., Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, *Immunol Rev.* (2011) 239(1): 45-61, Sakuma et al, Lentiviral vectors: basic to translational, *Biochem J.* (2012) 443(3):603-l8, Cooper et al, Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter, *Nucl. Acids Res. (*2015) 43 (1): 682-690, Zufferey et al, Self-Inactivating Lentivirus Vector for SaFc and Efficient In Vivo Gene Delivery, *J. Virol.* (1998) 72 (12): 9873-9880). Обычно при введении в хозяина инфицированные клетки экспрессируют антиген или неоантиген и тем самым вызывают иммунный ответ хозяина (например, CTL) против пептида (пептидов).

[0406] В зависимости от упаковочной способности вышеупомянутых платформ вакцин на основе вирусных векторов, в некоторых вариантах осуществления композиция вакцины включает один или несколько вирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы содержат последовательности, фланкированные немутантными последовательностями, разделенные линкерами или предшествующие одной или

нескольким последовательностям, нацеленным на субклеточный компартмент (см., например, Gros et al, Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients, *Nat Med.* (2016) 22 (4):433-8, Stronen et al, Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires, *Science.* (2016) 352 (6291): 1337-41, Lu et al, Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions, *Clin Cancer Res.* (2014) 20(13):3401-10). Вакцинные векторы и способы, применимые в протоколах иммунизации, описаны, например, в патентах США No. № 4722848. Другой вектор представляет собой BCG (Bacille Calmette Guerin). Векторы BCG описаны у Stover et al. (Nature 351: 456-460 (1991)). Широкий спектр других вакцинных векторов, применимых для терапевтического введения или иммунизации неоантигенов, например векторов Salmonella typhi и т. п., будет очевиден специалистам в данной области техники из приведенного в данном документе описания.

[0407] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с терапией онколитическим вирусом. В общем, онколитический вирус представляет собой вирус, созданный для заражения и уничтожения в основном раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к онколитическому вирусу, убивающему раковую клетку, онколитический вирус индуцирует иммунный ответ против раковой клетки.

[0408] В некоторых вариантах осуществления терапия гетеродимерным Fc-слитым белком комбинируется с терапией онколитическим вирусом для лечения субъекта, у которого диагностирована меланома/рак кожи. В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус включает талимоген лахерпарепвек (IMLYGIC®), также называемый T-VEC. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий субъединицы IL-12, применяется для лечения рака (например, запущенной злокачественной опухоли) в сочетании с онколитическим вирусом (например, Talimogene Laherparepvec (IMLYGIC®) или T-VEC).

[0409] Вышеприведенное описание описывает множество аспектов и вариантов осуществления изобретения. В патентной заявке конкретно рассматриваются все комбинации и перестановки аспектов и вариантов осуществления.

ПРИМЕРЫ

[0410] Изобретение, которое теперь описывается в целом, будет легче понять со ссылкой на следующие примеры, которые включены просто в целях иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1 - Способ получения

[0411] Белки по настоящему изобретению обычно получают с использованием технологии рекомбинантной ДНК. В одном служащем примером варианте осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый полипептид, включающий первую субъединицу многосубъединичного белка (субъединица p40 человеческого IL-12), слитую с первым полипептидом Fc-домена антитела, была клонирована в первый экспрессионный вектор (pSURE-Puro); вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй полипептид, включающий вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка (субъединица p35 человеческого IL-12), слитую со вторым полипептидом Fc-домена антитела, была клонирована во второй экспрессионный вектор (pET-pSURE-Puro); и первый и второй экспрессионные векторы были стабильно трансфицированы вместе в клетки-хозяева для получения гетеродимерных Fc-слитых белков.

[0412] Примерная аминокислотная последовательность, кодируемая первым экспрессионным вектором, показана в SEQ ID NO: 292. Первый экспрессионный вектор кодировал первый полипептид, содержащий субъединицу p40 человеческого IL-12, слитую с последовательностью человеческого IgG1 Fc, содержащей мутацию Y349C. Первый полипептид также включал мутации K360E и K409W, которые способствуют гетеродимеризации, и мутации LALAPA (L234A, L235A и P329A), которые снижают эффекторные функции. В SEQ ID NO: 292 лидерная последовательность показана курсивом, последовательность субъединицы p40 человеческого IL-12 подчеркнута и мутации выделены жирным шрифтом.

*MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC*WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMV
VLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG
EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC
WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYS
VECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPK
NLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK

DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSPKSSDK
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:292)

[0413] Примерная аминокислотная последовательность, кодируемая из второго экспрессионного вектора, показана в SEQ ID NO: 293. Второй экспрессионный вектор кодировал второй полипептид, содержащий субъединицу p35 человеческого IL-12, слитую с последовательностью человеческого IgG1 Fc, содержащей мутацию S354C. Второй полипептид также включал мутации Q347R, D399V и F405T, способствующие гетеродимеризации, и мутации LALAPA (L234A, L235A и P329A), снижающие эффекторные функции. В SEQ ID NO: 293 лидерная последовательность показана курсивом, последовательность субъединицы p35 человеческого IL-12 подчеркнута, и мутации выделены жирным шрифтом.

*MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAV
SNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCL
NSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL
LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI
KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDK
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:293)

[0414] Для достижения наивысшего выхода белка исследуют различные соотношения первого и второго экспрессионных векторов для определения оптимального соотношения для трансфекции в клетки-хозяева. После трансфекции отдельные клоны выделяют для

создания банка клеток с использованием способов, известных в данной области техники, таких как ограниченное разведение, ELISA, FACS, микроскопия или Clonepix.

[0415] Клоны культивируют в условиях, подходящих для масштабирования биореактора, и поддерживают экспрессию белков. Белки выделяют и очищают с использованием способов, известных в данной области техники, включая центрифугирование, глубинную фильтрацию, лизис клеток, гомогенизацию, замораживание-оттаивание, аффинную очистку, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, обменную хроматографию с гидрофобным взаимодействием и хроматографию в смешанном режиме.

Пример 2 - Подавление опухоли посредством IL-12, слитого с полипептидом Silent Fc-домена, в модели опухоли CT26

[0416] В данном примере описываются относительные способности двух слитых конструкций IL-12-Fc рекомбинантного мышиного IL-12 (rmIL-12) контролировать прогрессирование опухоли на модели рака толстой кишки у мышей. Два варианта слияния IL-12-Fc, использованные в данном примере, представляли собой mIL-12-Fc дикого типа (DF-mIL-12-Fc wt), который включает субъединицы p40 и p35 мышиного IL-12 дикого типа, слитые с N-концами полипептидов Fc-домена мышиного IgG2a дикого типа, и молчащий (silent) mIL-12-Fc (DF-mIL-12-Fc si), который включает субъединицы p40 и p35 мышиного IL-12 дикого типа, слитые с N-концами полипептидов мышиного IgG2a Fc-домена с мутациями L234A, L235A и P329G. Аминокислотные последовательности белков показаны ниже:

mIL-12-p40-mIgG2A-EW (первая цепь DF-mIL-12-Fc wt)

MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGV

IGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEIL
KNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAV
TCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEAR
QQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWST
PHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGG
NVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLG
GPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVH
TAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPI
ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTEKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE
WTNNGKTELNYKNTEP VLDSDGSYFMYSWLRVEKKNWVERN SYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPG (SEQ ID NO: 286)

mIL-12-p35-ntIgG2A-RVT (вторая цепь DF-ntIL-12-Fc wt)

RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDI
TRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLC
LGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLN
HNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSS
AGGGGSGGGGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIK
DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRED
YNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV
RAPRVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN
YKNTEPVLVSDGSYTMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH
TTKSFSRTPG (SEQ **ID** N0:287)

mIL-12-p40-mIgG2A-EW-LALAPG (первая цепь DF-mIL-12-Fc si)

MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGV
IGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEIL
KNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAV
TCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEAR
QQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWST
PHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGG
NVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNAA
GGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEV
HTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGA
PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTEKQVTLTCMVTDFMPEDIYV
EWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSWLRVEKKNWVERNSYSC
SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG (SEQ ID NO:288)

mIL-12-p35-mIgG2A-RVT-LALAPG (вторая цепь DF-mIL-12-Fc si)

RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDI
TRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLC
LGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLN
HNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSS
AGGGGSGGGGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIK
DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRED
YNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV
RAPRVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN
YKNTEPVLVSDGSYTMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH
TTKSFSRTPG (SEQ ID NO:289)

[0417] Вкратце, 10^6 клеток карциномы толстой кишки CT26-Tyrp1 инъецировали подкожно в бок мышей Balb/c. На 14-й день после инокуляции опухоли, когда объем опухоли достигал 270 мм^3, мышей рандомизировали в разные группы лечения (n = 10 на группу) и вводили

внутрибрюшинно 1 мкг rmIL-12, DF-mIL-12-Fc wt (дикого типа) в молярной дозе, эквивалентной 1 мкг rmIL-12, rmIL-12, DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 1 мкг rmIL-12, или 1 мкг контроля изотипа mIgG2a один раз в неделю. Рост опухоли оценивали в течение 60 дней.

[0418] Как показано на ФИГ. 5A-5C, хотя IL-12 (ФИГ. 5A) и DF-mIL-12-Fc wt (ФИГ. 5B) были эффективны в контроле прогрессирования опухоли у некоторых мышей, только DF-mIL-12-Fc si индуцировал устойчивую регрессию опухоли и давал 100% полную регрессию опухоли (ФИГ. 5C). Более того, общая выживаемость была значительно увеличена лечением терапией DF-mIL-12-Fc si - 100% обработанных мышей были все еще живы на 60-й день, тогда как среднее время выживания мышей, получавших изотипический контроль, DF-mIL-12-Fc wt и IL-12, составляло 27 дней, 33 дня и 46 дней, соответственно (ФИГ. 6).

[0419] Затем сравнивали различные дозы DF-mIL-12-Fc wt и DF-mIL-12-Fc si для контроля прогрессирования опухоли. Вкратце, 10^6 клеток карциномы толстой кишки CT26-Tyrp1 инъецировали подкожно в бок мышей Balb/c. На 14-й день после инокуляции опухоли, когда объем опухоли достигал 300 мм^3, мышей рандомизировали в разные группы лечения (n = 10 на группу) и вводили внутрибрюшинно DF-mIL-12-Fc wt в молярных дозах, эквивалентных 1 мкг или 0,1 мкг rmIL-12 или DF-mIL-12-Fc si в молярных дозах, эквивалентных 1 мкг или 0,1 мкг IL-12 один раз в неделю. Рост опухоли оценивали в течение 55 дней.

[0420] Как показано на ФИГ. 7A-7D, обработка с DF-mIL-12-Fc wt приводила к снижению прогрессирования опухоли у некоторых мышей и полной регрессии у двух мышей при дозе молярных эквивалентов 1 мкг rmIL-12 (ФИГ. 7A), но подавления опухоли не наблюдалось при дозе 0,1 мкг молярных эквивалентов IL-12 (ФИГ. 7C). Напротив, обработка DF-mIL-12-Fc si в дозе 1 мкг молярных эквивалентов IL-12 приводила к 100% полной регрессии опухоли (ФИГ. 7B) и вызывала устойчивую задержку роста опухоли при более низкой дозе 0,1 мкг молярных эквивалентов IL-12 (ФИГ. 7D). Медианная выживаемость мышей, получавших молярные эквиваленты 1 мкг IL-12 DF-mIL-12-Fc wt, составила 32 дня, что аналогично 34 дням медианной выживаемости мышей, получавших 0,1 мкг молярных эквивалентов IL-12 DF-mIL-12-Fc si, что позволяет предположить, что DF-mIL-12-Fc si был в 10 раз более активным, чем его вариант дикого типа (ФИГ. 8). DF-mIL-12-Fc wt не был эффективным при дозе 0,1 мкг молярных эквивалентов IL-12 и показал такую же медианную выживаемость 24 дня, что и группа, обработанная изотипом.

[0421] Затем сравнивали эффективность *in vivo* для различных путей введения DF-mIL-12-Fc si. Вкратце, 10^6 клеток карциномы толстой кишки CT26-Tyrp1 инъецировали подкожно в бок мышей Balb/c. На 14-й день после инокуляции опухоли, когда объем опухоли достигал 270 мм^3, мышей рандомизировали в разные группы лечения (n = 10 на группу) и вводили внутрибрюшинно или подкожно DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 1 мкг IL-12, или молярный эквивалент контрольного изотипа mIgG2a один раз в неделю. Рост опухоли оценивали на протяжении 60 дней.

[0422] Как показано на ФИГ. 22A - 22B, как внутрибрюшинное (ФИГ. 22A), так и подкожное (ФИГ. 22B) введение DF-mIL-12-Fc si индуцировало устойчивую регрессию опухоли и приводило к 100% полной регрессии опухоли. Таким образом, обработка DF-mIL-12-Fc si продемонстрировала эффективность при использовании различных способов введения.

Пример 3 - Подавление опухоли посредством IL-12, слитого с полипептидом Silent Fc-домена, в модели опухоли B16F10

[0423] В данном примере описываются относительные способности DF-mIL-12-Fc wt и DF-mTT-12-Fc si контролировать прогрессирование опухоли в модели меланомы мыши. Вкратце, 10^6 клеток меланомы B16F10 вводили подкожно мышам C57BL/6. На 8-й день после инокуляции опухоли, когда объем опухоли достигал 250 мм^3, мышей рандомизировали в разные группы лечения (n = 10) и лечили 0,5 мкг IL-12, DF-mIL-12-Fc wt в молярной дозе, эквивалентной 0,5 мкг IL-12, DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 0,5 мкг IL-12, или 0,5 мкг контроля изотипа mIgG2a один раз в неделю. Рост опухоли оценивали в течение 32 дней.

[0424] Как показано на ФИГ. 9A-9C, хотя каждая из протестированных конструкций IL-12-Fc задерживала прогрессирование опухоли, DF-mIL-12-Fc si был наиболее эффективным в контролировании роста опухоли. Медианное время выживания мышей, получавших DF-mIL-12-Fc si, составляло 29 дней, что было больше, чем медианные времена выживания мышей, получавших изотипический контроль, DF-mIL-12-Fc wt и IL-12, которые составляли 16, 26 и 22 дня, соответственно (ФИГ. 10).

[0425] Затем сравнивали различные дозы DF-mIL-12-Fc wt и DF-mIL-12-Fc si для контроля прогрессирования опухоли. Вкратце, 10^6 клеток меланомы B16F10 вводили подкожно в бок мышей C57BL/6. На 8-й день после инокуляции опухоли мышей рандомизировали в разные группы лечения (n = 10 на группу) и лечили внутрибрюшинно с 0,5 мкг или 0,1 мкг

молярных эквивалентов IL-12 DF-mIL-12-Fc wt или 0,5 мкг или 0,1 мкг молярных эквивалентов IL-12 DF-mIL-12-Fc si один раз в неделю. Рост опухоли оценивали в течение 30 дней.

[0426] Как показано на ФИГ. 11A-11D, DF-mIL-12-Fc si превосходил DF-mIL-12-Fc wt в подавлении роста опухоли при обеих дозах. Более того, при каждой дозе медианная выживаемость мышей, получавших DF-mIL-12-Fc wt, составляла 20 дней. Напротив, медианная выживаемость мышей, получавших 0,1 мкг молярных эквивалентов IL-12 DF-mIL-12-Fc si, составляла 21 день, и медианная выживаемость мышей, получавших 0,5 мкг молярных эквивалентов IL-12 DF-mIL-12-Fc si, составляла 28 дней (ФИГ. 12). Полученные результаты продемонстрировали, что высокая доза (0,5 мкг молярных эквивалентов IL-12) DF-mIL-12-Fc si значительно увеличивала выживаемость мышей по сравнению с его аналогом дикого типа или изотипическим контролем.

[0427] Затем введение однократной дозы лечения DF-mIL-12-Fc si сравнивали с ранее описанными еженедельными курсами лечения. Вкратце, 10^6 клеток меланомы B16F10 вводили подкожно мышам C57BL/6. На 8-й день после инокуляции опухоли, когда объем опухоли достигал 200 мм^3, мышей рандомизировали в разные группы лечения (n = 10) и лечили DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 0,5 мкг IL-12, или молярным эквивалентом контрольного изотипа mIgG2a один раз в неделю. Рост опухоли оценивали в течение 39 дней.

[0428] Как показано на ФИГ. 23, однократное введение DF-mIL-12-Fc si приводило к уменьшению роста опухоли у 100% мышей, хотя рост опухоли происходил быстрее по сравнению с еженедельными введениями (ФИГ. 9C). Кроме того, мыши демонстрировали временную потерю массы, но только после первой дозы (данные не показаны). Соответственно, однократное введение DF-mIL-12-Fc si продемонстрировало начальную эффективность на модели трудно поддающейся лечению опухоли, хотя последующие еженедельные введения лучше задерживают рост опухоли в данной модели.

[0429] Затем сравнивали эффективность *in vivo* для различных путей введения DF-mIL-12-Fc si. Вкратце, 10^6 клеток меланомы B16F10 вводили подкожно мышам C57BL/6. На 7-й день после инокуляции опухоли, когда объем опухоли достигал 260 мм^3, мышей рандомизировали в разные группы лечения (n = 10) и лечили либо внутрибрюшинно, либо подкожно с DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 1 мкг IL-12, или молярным

эквивалентом контрольного изотипа mIgG2a один раз в неделю. Рост опухоли оценивали в течение 40 дней.

[0430] Как показано на ФИГ. 24A - 24B, как внутрибрюшинное (ФИГ. 24A), так и подкожное (ФИГ. 24B) введение DF-mIL-12-Fc si индуцировало регрессию опухоли у 100% мышей. Таким образом, лечение DF-mIL-12-Fc si продемонстрировало эффективность при использовании различных путей введения.

Пример 4 - *In vitro* эффективность DF-hIL-12-Fc wt и rhIL-12

[0431] Эффективность DF-hIL-12-Fc si по сравнению с rhIL-12 оценивали с использованием биоанализов *in vitro*.

[0432] Эффективность IL-12 оценивали с использованием анализа с репортерными клетками HEK-Blue на IL-12. Репортерные клетки IL-12R+ HEK-Blue (InvivoGen) собирали из культуры и доводили до 1×10^6 клеток/мл в культуральной среде. DF-hIL-12-Fc si (DF IL-12-Fc) и рекомбинантный человеческий IL-12 (rhIL-12; PeproTech) разводили в среде. 100 мкл суспензии PBMC смешивали со 100 мкл разведенного исследуемого вещества и инкубировали в течение 48 часов. Собирали супернатант и определяли вовлечение рецептора IL-12 и сигнальных компонентов, стабильно экспрессируемых репортерными клетками, путем измерения секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы из клеток в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 25 мкл супернатанта образца смешивали с 200 мкл реагента QUANTI-Blue и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем планшет считывали с помощью планшет-ридера SpectraMax i3x при 620 нМ, и сообщалось, что оптическая плотность отражает относительную активность IL-12.

[0433] Как показано на ФИГ. 13A, продукция SEAP репортерными клетками IL-12R+ HEK возрастала с увеличением концентрации DF-hIL-12-Fc si или rhIL-12. Измеренные ответы IL-12 в анализе с репортерными клетками HEK-Blue были сопоставимы между DF-hIL-12-Fc si и rhIL-12 в исследованных концентрациях.

[0434] Затем оценивали активность IL-12 путем количественного определения продукции IFN-γ из человеческих PBMC. PBMC выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности и доводили до 1×10^6 клеток/мл в культуральной среде. DF-hIL-12-Fc si и рекомбинантный человеческий IL-12 (rhIL-12) разводили в среде. 100 мкл суспензии PBMC смешивали со 100 мкл разведенного

исследуемого вещества и инкубировали в течение 48 часов. Собирали супернатант и количественно определяли IFN-γ с использованием набора Human IFN-g ELISA MAX (BioLegend). После проявления планшетов для анализа ELISA IFN-γ их считывали с помощью прибора SpectraMax i3x при 450 нм с вычитанием фона при 540 нм. Содержание IFN-γ в лунках для образцов было определено приблизительно путем интерполяции показаний образца из стандартной кривой анализа.

[0435] Как показано на ФИГ. 13B, продукция IFN-γ увеличивалась, когда человеческие PBMC культивировали с DF-hIL-12-Fc si или rhIL-12 с одновременной обработкой 5 мкг/мл PHA для усиления величины ответа IFN-γ. Продукция IFN-g после стимуляции IL-12 была сопоставима между DF-hIL-12-Fc si и rhIL-12 в исследованных концентрациях.

[0436] Соответственно, хотя значения EC50 для двух типов клеток и условий стимуляции различались более чем на порядок, сопоставимая активность DF-hIL-12-Fc si и rhIL-12 была продемонстрирована в обоих анализах, что позволяет предположить эффективность действия конструкции DF-hIL-12-Fc si, которая проявляет эффективность, аналогичную таковой у нативного рекомбинантного человеческого IL-12.

Пример 5 - Концентрации IL-12, DF-hIL-12-Fc si и IFN-γ в плазме обезьян после внутривенного вливания DF-hIL-12-Fc si или rhIL-12

[0437] Фармакодинамику (PD) и фармакокинетику (PK) оценивали у яванских макак после внутривенной инфузии DF-hIL-12-Fc si или rhIL-12.

[0438] Обезьянам Cynomolgus вводили DF-hIL-12-Fc si и рекомбинантный человеческий IL-12 в дозе 10 мкг/кг путем внутривенной инфузии.

[0439] Иммуноанализ использовали для обнаружения DF-hIL-12-Fc si и человеческого IL-12 на основе набора Quantikine ELISA. Иммуноанализ человеческого IL-12 p70: в данном анализе использовалась методика количественного иммуноферментного анализа типа сэндвич. Моноклональные антитела, специфичные для человеческого IL-12 p70, использовали в качестве твердофазного захвата, и детектирование осуществляли с использованием репортера, меченного HRP. Стандарты и контрольные образцы с добавлением эталонного стандарта rhIL-12 или DF-hIL-12-Fc si, вместе с тестируемыми образцами, пипетировали в лунки микротитрационного планшета, и любой IL-12 p70, присутствующий в образцах, связывался иммобилизованным антителом, на твердой фазе. Несвязанные вещества смывали, и в лунки добавляли поликлональные антитела,

специфичные для p70 человеческого IL-12. Несвязанные реагенты антитело-фермент смывали и в каждую лунку добавляли субстрат TMB. В результате ферментативной реакции образуется синий продукт, который становится желтым при добавлении кислотного стоп-раствора. Интенсивность цвета, измеренная в каждой лунке, прямо пропорциональна количеству rhIL-12 или DF-hIL-12-Fc, связанного на начальной стадии. Планшеты считывали при 450 нм с эталоном 540 нм на считывающем устройстве для микропланшетов SpectraMax с программным обеспечением для сбора данных SoftMax Pro Enterprise версии 4.6. Данные были преобразованы в текстовый файл и импортированы/обработаны в программе Watson LIMS v.7.2.0.02. Регрессия была выполнена с использованием подбора логистической кривой (автооценка) (Logistic (Auto Estimate) curve fitting) с весовым коэффициентом 1.

[0440] Иммуноанализ (meso scale discovery (MSD) - ELISA-подобный иммуноанализ), который также использовали для обнаружения DF-hIL-12-Fc si, включал покрытие необработанного микротитровального планшета MSD обезьяньим-адсорбированным козьим античеловеческим IgG и инкубацию при комнатной температуре. Планшет промывали, блокировали, промывали и инкубировали с образцами калибровочной кривой и контроля качества с добавлением эталонного стандарта DF-hIL-12-Fc si вместе с тестируемыми образцами. После данной инкубации планшет промывали и добавляли в планшет биотин против p40 человеческого IL-12/IL-23 в качестве первичного детектирующего антитела. После еще одной стадии промывки добавляли конъюгированный со стрептавидином Sulfo-Tag в качестве вторичного детектирующего антитела. Планшет промывали в последний раз, добавляли буфер T для считывания MSD (MSD Read Buffer T) и считывали планшет с помощью MSD Sector Imager S600. Необработанные данные MSD были экспортированы в текстовый файл, который затем был преобразован в файл, совместимый с Watson LIMS, с использованием запрограммированной электронной таблицы Excel, которая была специально разработана в Envigo. Данные были импортированы и обработаны в программе Watson LIMS Software v.7.2.0.02.

[0441] Для относительного количественного измерения провоспалительных биомаркеров NHP в плазме яванского макака был выполнен способ обнаружения meso scale discovery. Способ использовал процедуру сэндвич-иммуноанализа для относительного количественного измерения биомаркеров провоспалительной панели 1: IFN-γ, IE-1b, IL-2, IL-6, IL-8 и IL-10 в K2 EDTA плазмы яванского макака (упомянутой как плазма обезьяны).

Способ основан на наборах MSD для приматов (NHP) для V-PLEX и V-PLEX Plus, каталожный № K15056D-1, K15056D-2, K15056D-4, K15056D-6, K15056G-1, K15056G-2, K15056G-4, K15056G-6. В данном способе используются человеческие улавливающие и детектирующие антитела, которые реагируют с антителами яванского макака. В набор входят планшеты, предварительно покрытые захватывающими антителами на независимых четко определенных точках в каждой лунке 96-луночного многоточечного планшета. Планшет инкубировали с образцами плазмы обезьяны, промывали и затем инкубировали с детектирующими антителами (специфичными для каждого аналита), которые конъюгированы с электрохемилюминесцентными (ECL) метками (MSD SULFO-TAG). Аналиты в образце связываются для захвата антител, иммобилизованных на поверхности рабочего электрода; рекрутинг детектирующих антител связанными аналитами завершает сэндвич. Планшет промывали и добавляли буфер считывания MSD для создания соответствующей химической среды для электрохемилюминесценции (ECL). Планшет загружали в прибор MSD Sector Imager 600 (SI600), где на электроды планшета подавали напряжение, заставляя захваченные метки излучать свет. Прибор измеряет интенсивность излучаемого света в единицах относительного света (RLU), чтобы обеспечить относительное количественное измерение анализируемых веществ в образце. Необработанные данные RLU были экспортированы в текстовый файл, который затем был преобразован в файл, совместимый с Watson LIMS, с использованием запрограммированной электронной таблицы Excel, которая была специально разработана в Envigo. Впоследствии данные были импортированы и обработаны в программе Watson LIMS Software v.7.2.0.02.

[0442] ФИГ. 14 показывает относительные концентрации в плазме DF-hIL-12-Fc si и рекомбинантного человеческого IL-12 в течение времени после внутривенного введения. Данные показывают, что концентрации DF-hIL-12-Fc si и rhIL-12 со временем снижались, как и ожидалось. Однако DF-hIL-12-Fc si продемонстрировал более длительный период полувыведения и в целом увеличенную экспозицию по сравнению с rhTE-12 с течением времени.

[0443] На ФИГ. 14 также показаны относительные концентрации IFN-γ (PD) в плазме обезьян после внутривенного введения. Данные показывают, что фармакодинамика DF-hIL-12-Fc si и rhIL-12, оцениваемая по продукции IFN-γ, продемонстрировала активность после внутривенного введения. Однако DF-hIL-12-Fc si продемонстрировал более высокую пиковую активность и увеличенную продолжительность по сравнению с rhIL-12.

Пример 6 - Фармакологическая характеристика суррогата мышиного DF-mIL-12-Fc si

[0444] Исследовали период полужизни в сыворотке и фармакодинамику *in vivo* для варианта мышиного IL-12 с увеличенным периодом полужизни, обозначенного как DF-mIL-12-Fc si.

[0445] Эквивалентное молярное количество DF-mIL-12-Fc si, соответствующее 1 мкг IL-12, вводили внутривенно мышам Balb/c, не несущим опухоли, и характеристики PK/PD сравнивали с IL-12. Нелеченным Balb/c (n = 6) внутривенно вводили 1 мкг DF-mIL-12-Fc si и IL-12 (молярный эквивалент 1 мкг IL-12). Образцы крови брали через 0,017, 0,5, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 144 и 219 часов после инъекции. Уровни IL-12 и IFN-γ в сыворотке анализировали с помощью ELISA, как описано ранее.

[0446] Как показано на ФИГ. 15A и 15B и количественно определено в таблице 15, DF-mIL-12-Fc si показал длительный период полужизни в сыворотке, составлявший приблизительно 30 часов (ФИГ. 15B, DF-mIL-12-Fc si Ti/2 = 29,85 часа), что было в 5 раз дольше, чем у IL-12 (ФИГ. 15A; IL-12 T1/2 = 6,05 часа). Помимо увеличенного периода полужизни, продукция IFN-γ, опосредованная DF-mIL-12-Fc si (AUC = 916654), также была увеличена по сравнению с IL-12 (AUC = 20304).

[0447] Затем сравнивали свойства PK/PD для различных путей введения DF-mIL-12-Fc si. Эквивалентное молярное количество DF-mIL-12-Fc si, соответствующее 1 мкг IL-12, вводили в виде однократной дозы мышам Balb/c, не несущим опухоли, путем внутривенного, внутрибрюшинного или подкожного введения, и характеристики PK/PD оценивались, как описано.

[0448] Как показано на ФИГ. 15C-15E и количественно в таблице 16, внутривенное (ФИГ. 15C), внутрибрюшинное (ФИГ. 15D) или подкожное (ФИГ. 15E) введение приводили к опосредованной DF-mIL-12-Fc si продукции IFN-γ, сравнимой для различных путей введения. Примечательно, что подкожное введение привело к снижению Cmax IL-12. Соответственно, фармакокинетические свойства (например, концентрация IL-12) введения DF-mIL-12-Fc si варьировались в зависимости от пути введения, в то время как фармакодинамические свойства (продукция IFN-γ) оставались длительными и относительно сопоставимыми для различных путей.

Таблица 15 - Фармакологические характеристики DF-mIL-12-Fc si и rmIL-12

	IL-12	**IFN-γ** 10

	T112	**Span**	**Tmax**	**Cmax**	**AUC**	**AUC**
rmIL-12	6,05	9,15	0,13	358,65	999,81	20304
DF-mIL-12-Fc	29,85	6,92	0,19	258,20	5636,49	916654

Таблица 16 - Фармакологические характеристики DF-mIL-12-Fc si через IV, IP и SC

	Tl/2	**Span**	**Tmax**	**Cmax**	**AUC**
Внутривенное	31,5	6,4	0,2	257,2	5985,6
Внутрибрюшинное	34,70	5,19	*NIA*	75,09	3964,21
Подкожное	37,5	4,1	36,0	23,1	1938,1

Пример 7 - Комбинация DF-mIL-12-Fc si и блокады PD-1 в модели мыши B16F10

[0449] Комбинированную терапию DF-mIL-12-Fc si и блокадой PD-1 проводили для анализа того, можно ли усилить противоопухолевый иммунный ответ в установившихся опухолях B16F10.

[0450] Мышам C57BL/6 инъецировали 10^6 клеток меланомы B16F10 подкожно в бок мышам. На 8-й день после инокуляции опухоли мышей рандомизировали (h = 10 на группу). Когда средний объем опухоли достигал 245 мм^3, мышам внутрибрюшинно вводили 0,5 мкг изотипического контроля, 0,5 мкг DF-mIL-12-Fc si, 200 мкг анти-PD-1 клона RMP1-14 или комбинированного DF-mIL-12-Fc si/анти-PD-l. Животным вводили один раз в неделю DF-mIL-12-Fc si и два раза в неделю анти-PD-1. Рост опухоли оценивали в течение 60 дней, а также отслеживали выживаемость и массу тела.

[0451] Как показано на ФИГ. 16A - 16C, в то время как введение отдельно DF-mIL-12-Fc si задерживало регрессию опухоли (ФИГ. 16A) и PD-1 отдельно оказывал минимальное влияние на рост опухоли (ФИГ. 16B), комбинация DF-mIL-12-Fc si с блокадой PD-1 дополнительно замедляла рост опухоли (ФИГ. 16C), что дает основание предполагать, что лечение анти-PD-1 дополнительно усиливало противоопухолевые ответы на лечение DF-mIL-12-Fc si.

[0452] Как показано на ФИГ. 17A и 17B, общая выживаемость с терапией DF-mIL-12-Fc si и в сочетании с блокадой PD-1 увеличивалась, показывая медианную выживаемость 29 дней (монотерапия DF-mIL-12-Fc si) и 36 дней (комбинация) по сравнению с 15 днями изотипа и 17,5 дней у мышей, обработанных 200 мкг анти-PD-1 (ФИГ. 17A). Примечательно, что, несмотря на высокую скорость ответа, схема DF-mIL-12-Fc si и комбинированная терапия, по-видимому, хорошо переносились мышами с опухолью B16F10 (ФИГ. 17B).

[0453] Соответственно, комбинированная терапия DF-mIL-12-Fc si и блокадой PD-1 продемонстрировала улучшенную эффективность по сравнению с любым лечением по отдельности.

Пример 8 - Комбинация DF-mIL-12-Fc si и mcFAE-C26.99 TriNKET в модели мыши B16F10

[0454] Комбинированную терапию DF-mIL-12-Fc si и mcFAE-C26.99 TriNKET проводили для анализа того, можно ли усилить противоопухолевый иммунный ответ в сформировавшихся опухолях B16F10.

[0455] Мышам C57BL/6 инъецировали 10^6 клеток меланомы B16F10 подкожно в бок мышам. На 7-й день после инокуляции опухоли мышей рандомизировали (h = 10 на группу). Когда средний размер опухоли достигал 200 мм^3, мышей внутрибрюшинно вводили 150 мкг изотипического контроля или 0,5 мкг DF-mIL-12-Fc si, 150 мкг TriNKET или комбинацию DF-mIL-12-Fc si/TriNKET. Рост опухоли оценивали в течение 60 дней, а также отслеживали выживаемость и массу тела.

[0456] Как показано на ФИГ. 18A, монотерапия DF-mIL-12-Fc si приводила к уменьшению роста опухоли. Обработка mcFAE-C26.99 TriNKET в качестве единственного средства при начальном объеме опухоли 200 мм^3 не приводила к замедленному прогрессированию опухоли (ФИГ. 18B). Напротив, комбинация DF-mIL-12-Fc si с mcFAE-C26.99 дополнительно усиливала противоопухолевые ответы по сравнению с одним DF-mIL-12-Fc si (ФИГ. 18C) и приводила к 30% полных респондеров (complete responders (CR)) (n = 3), давая основание предполагать, что лечение TriNKET дополнительно усиливало противоопухолевые ответы на лечение DF-mIL-12-Fc si.

[0457] Как показано на ФИГ. 19A, общая выживаемость при терапии DF-mIL-12-Fc si и в комбинации с mcFAE-C26.99 TriNKET была увеличена, показав медианную выживаемость 29 дней (монотерапия DF-mIL-12-Fc si) и 60 дней (комбинация TriNKET) по сравнению с 16 днями изотипа и 17 днями у мышей, обработанных TriNKET. Примечательно, что, несмотря на высокую скорость ответа, схема DF-mIL-12-Fc si и комбинированная терапия, по-видимому, хорошо переносились мышами с опухолью B16F10 (ФИГ. 19B).

[0458] Три полных респондера (CR из эксперимента, описанного выше, и данные, представленные на ФИГ. 18C) были повторно заражены 2×10^6 клетками меланомы B16F10 через 72 дня после первой инокуляции опухоли. Соответствующие по возрасту нелеченные

мыши C57BL/6 использовались в качестве контрольной группы. 1 из 3 мышей из исходной группы, получавшей комбинацию DF-mIL-12-Fc si/TriNKET, оставалась без опухолей, у другой мыши было обнаружено образование опухоли, начиная с 95-го дня, и прогрессирование опухоли у третьей мыши было аналогично тому, как у мыши того же возраста из контрольной группы (ФИГ. 20), что свидетельствует об образовании иммунологической памяти при комбинированной терапии.

[0459] Соответственно, комбинированная терапия DF-mIL-12-Fc si и TriNKET продемонстрировала улучшенную эффективность по сравнению с любым лечением по отдельности, включая демонстрацию полного и стойкого ответа в популяции мышей.

Пример 9 - Обработка DF-mIL-12-Fc si способствует полному выздоровлению на модели опухоли CT26.

[0460] Данный пример показывает, что лечение DF-mIL-12-Fc si способствует выздоровлению у мышей, несущих опухоли CT26.

[0461] Вкратце, 10^6 клеток карциномы толстой кишки CT26-Tyrp1 инъецировали подкожно в бок мышей Balb/c. На 14 день после инокуляции опухоли, когда объем опухоли достигал 270 мм^3, мышей рандомизировали в разные группы лечения и внутрибрюшинно вводили 1 мкг DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 1 мкг rmIL-12, или 1 мкг контроля изотипа mIgG2a один раз в неделю. Рост опухоли оценивали в течение 60 дней. Полных респондеров повторно провоцировали 10^6 клетками CT26 через 72 дня после первой инокуляции опухоли. Соответствующие по возрасту нелеченные мыши Balb/C использовались в качестве контрольной группы.

[0462] ФИГ. 21A представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26 и которым вводили однократную дозу 1 мкг изотипа DF-mIL-12-Fc si или mIgG2a. ФИГ. 21B представляет собой график, показывающий массу тела отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26 и которым еженедельно вводили дозу 1 мкг изотипа DF-mIL-12-Fc si или mIgG2a. ФИГ. 21C представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли у отдельных мышей, повторно зараженных инокуляцией опухолевых клеток CT26.

[0463] Как показано на ФИГ. 21A-B, введение DF-mIL-12-Fc si приводило к устойчивой регрессии опухоли по сравнению с изотипом mIgG2a без наблюдаемой токсичности, влияющей на массу тела животных, получавших лечение. Как показано на ФИГ. 21C, мыши,

исходно обработанные DF-mIL-12-Fc si, оставались без опухолей, что свидетельствует об образовании иммунологической памяти при лечении DF-mIL-12-Fc si.

Пример 10 -DF mIL-12-Fc si, введенный внутрибрюшинно или подкожно, эффективен для уменьшения объема опухоли в модели опухоли CT26.

[0464] Данный пример показывает, что внутрибрюшинное или подкожное введение DF-mIL-12-Fc si обеспечивает 100% полное выздоровление у мышей с опухолями CT26.

[0465] Вкратце, 10^6 клеток карциномы толстой кишки CT26-Tyrp1 инъецировали подкожно в бок мышей Balb/c. На 14-й день после инокуляции опухоли, когда объем опухоли достигал 270 мм^3, мышей рандомизировали в разные группы лечения и внутрибрюшинно вводили 1 мкг DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 1 мкг IL-12, или 1 мкг контроля изотипа mIgG2a один раз в неделю, или подкожно вводили 1 мкг DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 1 мкг IL-12, или 1 мкг контроля изотипа mIgG2a один раз в неделю. Рост опухоли оценивали на протяжении более 60 дней.

[0466] ФИГ. 22A представляет собой график, показывающий кривую роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26 и которым еженедельно вводили дозу 1 мкг изотипа DF-mIL-12-Fc si или mIgG2a, введенную внутрибрюшинно. ФИГ. 22B представляет собой график, показывающий кривую роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26 и которым еженедельно вводили дозу 1 мкг DF-mIL-12-Fc si или изотипа mIgG2a, вводимую подкожно.

[0467] Как показано на ФИГ. 22A-B, внутрибрюшинная или подкожная доставка DF-mIL-12-Fc si была эффективной для уменьшения объема опухоли CT26.

Пример 11 - Введение однократной дозы DF-mIL-12-Fc si эффективно для уменьшения объема опухоли в модели мышей B16F10.

[0468] Данный пример показывает, что однократная доза DF-mI-12-Fc si эффективна для уменьшения объема опухоли у мышей, несущих опухоли меланомы B16F10.

[0469] Вкратце, мышам C57BL/6 инъецировали 10^6 клеток меланомы B16F10 подкожно в бок мышам. На 7-й день после инокуляции опухоли мышей рандомизировали. Когда средний размер опухоли достигал 200 мм^3, мышам вводили внутрибрюшинно однократную дозу изотипического контроля или 1 мкг DF-mIL-12-Fc si. Рост опухоли оценивали в течение 50 дней.

[0470] Как показано на ФИГ. 23, однократное введение мкг DF-mIL-12-Fc si эффективно для уменьшения объема опухоли у мышей с опухолью B16F10.

Пример 12 - DF-mIL-12-Fc si, введенный внутрибрюшинно или подкожно, эффективен для уменьшения объема опухоли в модели мышей B16F10

[0471] Данный пример показывает, что внутрибрюшинное или подкожное введение DF-mIL-12-Fc si привело к 100% полному выздоровлению у мышей с опухолями меланомы B16F10.

[0472] Вкратце, 10^6 клеток меланомы B16F10 инъецировали подкожно в бок мышей C57BL/6. На 7-й день после инокуляции опухоли мышей рандомизировали. Когда средний размер опухоли достигал 200 мм^3, мышам внутрибрюшинно вводили 1 мкг DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 1 мкг IL-12, или 1 мкг контроля изотипа mIgG2a один раз в неделю, или подкожно вводили 1 мкг DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 1 мкг IL-12, или 1 мкг контроля изотипа mIgG2a один раз в неделю. Рост опухоли оценивали в течение 40 дней.

[0473] Как показано на ФИГ. 24A-B, внутрибрюшинная или подкожная доставка DF-mIL-12-Fc si была эффективной для уменьшения объема опухоли B16F10 по сравнению с изотипическим контролем.

Пример 13 - DF-mIL-12-Fc si эффективен в виде однократной дозы.

[0474] Данный пример показывает, что DF-mIL-12-Fc si эффективен для уменьшения объема опухоли CT26 при введении в виде однократной дозы, и при введении посредством повторного дозирования он даже более эффективен.

[0475] Вкратце, 10^6 клеток карциномы толстой кишки CT26-Tyrp1 инъецировали подкожно в бок мышей Balb/c. На 14-й день после инокуляции опухоли, когда объем опухоли достигал 270 мм^3, мышей рандомизировали в разные группы лечения (n = 10 на группу) и внутрибрюшинно вводили однократную дозу 1 мкг DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 0,1 мкг IL-12, или 1 мкг контроля изотипа mIgG2a один раз в неделю.

В качестве альтернативы, мышам внутрибрюшинно вводили 1 мкг DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 1 мкг IL-12, или 1 мкг контроля изотипа mIgG2a один раз в неделю. Рост опухоли оценивали в течение более 60 дней.

[0476] ФИГ. 25A представляет собой график, показывающий кривую роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26 и которым вводили однократную дозу 1 мкг изотипа DF-mIL-12-Fc si или mIgG2a. ФИГ. 25B представляет собой график, показывающий кривую роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных опухолевыми клетками CT26 и которым еженедельно вводили дозу 1 мкг изотипа DF-mIL-12-Fc si или mIgG2a.

[0477] Как показано на ФИГ. 21A и ФИГ. 25A, однократное введение 1 мкг DF-mIL-12-Fc si приводило к устойчивому 70% полному выздоровлению мышей с опухолью по сравнению с изотипом mIgG2a. Однако, как показано на ФИГ. 5C и ФИГ. 25B, повторное еженедельное введение 1 мкг DF-mIL-12-Fc si гарантировало 100% полное выздоровление мышей с опухолью по сравнению с изотипом mIgG2a. Как показано на ФИГ. 21B, даже повторное введение DF-mIL-12-Fc si хорошо переносилось, при оценке по массе тела токсичность не наблюдались.

[0478] Кроме того, полных респондеров (CR) повторно заражали 5×10^5 клетками карциномы толстой кишки CT26-Tyrp1 в противоположном боку и прогрессирование опухоли сравнивали с нелеченными мышами, зараженными той же дозой опухоли. Как показано на ФИГ. 21C, в то время как опухоли росли у нелеченных мышей, 100% полных респондеров оставались свободными от опухолей после повторного заражения. Соответственно, однократное введение DF-mIL-12-Fc si демонстрировало полный, стойкий ответ в популяции мышей.

Пример 14 - Фармакокинетика у яванских макак, получавших однократную подкожную дозу DF-hIL-12-Fc si

[0479] Фармакокинетику определяли после подкожной инъекции DF-ML-12-FC si в дозе 1 мкг/кг (ФИГ. 28A), 2 мкг/кг (ФИГ. 28B) или 4 мкг/кг (ФИГ. 28C) у яванских макак с использованием иммуноферментного анализа типа ELISA - способа иммуноанализа Meso Scale Discovery (MSD). Вкратце, необработанный микротитровальный планшет MSD покрывали обезьяньим-адсорбированным козьим антителом против человеческого IgG и инкубировали при комнатной температуре. После нанесения покрытия и инкубации планшет промывали, блокировали, промывали и инкубировали с образцами калибровочной кривой и контроля качества с добавлением эталонного стандарта DF-hIL-12-Fc si вместе с тестируемыми образцами. После инкубации планшет промывали и добавляли в планшет

биотин против человеческого IL-12/IL-23 p40 в качестве первичного детектирующего антитела. После другой стадии отмывки в качестве вторичного детектирующего антитела добавляли конъюгированный со стрептавидином Sulfo-Tag. Планшет промывали последний раз перед добавлением буфера T для считывания MSD на планшет. Планшет считывали с помощью MSD Sector Imager S6000.

[0480] ФИГ. 28A-28C представляют собой линейные графики, показывающие фармакокинетику у яванских макак, получавших однократную подкожную дозу 1 мкг/кг (ФИГ. 28A), 2 мкг/кг (ФИГ. 28B) или 4 мкг/кг (ФИГ. 28C) DF-hIL-12-Fc si.

[0481] Данные показывают, что концентрации DF-hIL-12-Fc si и rhIL-12 со временем снижались, как и ожидалось, с аналогичными фармакокинетическими профилями при всех испытанных дозах.

Пример 15 - Высвобождение цитокинов у яванских макак, получавших однократную подкожную дозу DF-hIL-12-Fc si

[0482] Количественные измерения цитокинов после подкожной инъекции DF-hIL-12-Fc si в дозе 1 мкг/кг (ФИГ. 29A и 29B), 2 мкг/кг (ФИГ. 29C и 29D) или 4 мкг/кг (ФИГ. 29E и 29F) у яванских макак определяли с использованием наборов для иммуноанализа MSD. В способе использовались сэндвич-наборы для иммуноанализа (провоспалительные биомаркеры панели 1 и набор NHP V-PLEX Plus Chemokine Panel 1) для относительного количественного измерения провоспалительных биомаркеров панели 1: IFN-γ, IE-1b, IL-2, IL-6, IL-8 и IL-10 в плазме K2 EDTA яванского макака (называемой плазмой обезьяны). Способ основан на наборах MSD для приматов (NHP) для V-PLEX и V-PLEX Plus, каталожный № K15056D-1, K15056D-2, K15056D-4, K15056D-6, K15056G-1, K15056G-2, K15056G-4, K15056G-6. В данном способе используются человеческие улавливающие и детектирующие антитела, которые реагируют с яванскими макаками. В набор входят планшеты, предварительно покрытые захватывающими антителами на независимых, четко определенных точках в каждой лунке 96-луночного многоточечного планшета. Планшет инкубировали с образцами плазмы обезьяны, промывали и затем инкубировали с детектирующими антителами (специфичными для каждого аналита), которые конъюгированы с электрохемилюминесцентными (ECL) метками (MSD SULFO-TAG). Аналиты в образце связываются для захвата антител, иммобилизованных на поверхности рабочего электрода; набор детектирующих антител связанными аналитами завершает сэндвич. Планшет

промывали и добавляли буфер считывания MSD для создания соответствующей химической среды для электрохемилюминесценции (ECL). Планшет загружали в прибор MSD Sector Imager 600 (SI600), где на электроды пластины подавали напряжение, заставляя захваченные метки излучать свет. Прибор измеряет интенсивность излучаемого света в единицах относительного света (RLU), чтобы обеспечить относительное количественное измерение анализируемых веществ в образце. Необработанные данные RLU были экспортированы в текстовый файл, который затем был преобразован в файл, совместимый с Watson LIMS, с использованием запрограммированной электронной таблицы Excel, которая была специально разработана в Envigo. Впоследствии данные были импортированы и обработаны в Watson LIMS Software v.7.2.0.02.

[0483] ФИГ. 29A-29F представляют собой линейные графики, показывающие концентрации IFN-γ (ФИГ. 29A, 29C и 29E) и IP10/CXCL10 (ФИГ. 29B, 29D и 29F) у яванских макак, получавших однократную подкожную дозу 1 мкг/кг (ФИГ. 29A и 29B), 2 мкг/кг (ФИГ. 29C и 29D) или 4 мкг/кг (ФИГ. 29E и 29F) DF-hIL-12-Fc si.

[0484] Как показано на ФИГ.29A, однократная подкожная доза DF-hIL-12-Fc si в дозе 1 мкг/кг не привела к детектируемым уровням IFN-γ. Подкожные дозы DF-hIL-12-Fc si в 2 мкг/кг и 4 мкг/кг приводили к увеличению уровней IFN-γ у некоторых животных, которые достигли пика на 4 день после введения дозы (ФИГ. 29C и 29E). Все одкожные дозы DF-hIL-12-Fc si в количестве 1 мкг/кг, 2 мкг/кг и 4 мкг/кг приводили к повышенным уровням IP10/CXCL10, которые достигли пика на 4-й день после введения дозы (Фиг. 29B, 29D и 29F).

Пример 16. Комбинированная терапия DF-mIL-12-Fc si с использованием лучевой терапии или химиотерапии на модели ортотопических мышей 4T1.

[0485] Чтобы показать, можно ли усилить противоопухолевую активность, вызванную введением DF-mIL-12-Fc si, были проведены комбинированные исследования с использованием лучевой терапии или химиотерапии. Вкратце, мышам Balb/c ортотопически вводили в жировую подушку молочной железы 5×10^5 опухолевых клеток 4Tl-luc. На 14-й день после инокуляции опухоли мышей рандомизировали (n = 10 на группу). Мышам вводили подкожно изотип, DF-mIL-12-Fc si (оба эквимолярные по отношению к 1 мкг IL-12), 5 мг/кг Doxil® (химиотерапия) внутривенно, или облучали 10 Гр в качестве монотерапии, или DF-mIL-12-Fc si в сочетании с Doxil® или облучением. Рост опухоли

оценивали с течением времени. ФИГ. 30 представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли у отдельных мышей, инокулированных клетками рака молочной железы и которым еженедельно вводили дозу изотипического контроля, DF-mIL-12-Fc si, Doxil (химиотерапия), или облученных 10 Гр в качестве монотерапии, или DF-mIL-12-Fc si в сочетании с Doxil® или облучением. На графике показаны средние значения роста опухоли по группе ± среднее значение стандартной ошибки.

[0486] Как видно на ФИГ. 30, хотя монотерапия DF-mIL-12-Fc si была эффективна сама по себе у мышей с опухолью 4T1, комбинированная терапия усиливала противоопухолевые иммунные ответы, приводя к полной регрессии опухоли у от 10 до 30% мышей.

Пример 17 - Опосредованная DF-mIL-12-Fc si противоопухолевая эффективность против крупных, устойчивых к блокаде PD-1 опухолей карциномы толстой кишки CT26

[0487] В данном примере анализируется, вызывает ли DF-mIL-12-Fc сильные противоопухолевые ответы против опухолей CT26-Tyrpl, устойчивых к блокаде PD-1. Вкратце, мышам Balb/c вводили 0,5 × 10^6 опухолевых клеток CT26-Tyrpl. После инокуляции, когда средний объем опухоли достигал ~ 120 мм^3, мышей рандомизировали на 9-й день. Мышей лечили либо изотипом 200 мкг, либо антителом против PD-1 (два раза в неделю). ФИГ. 31A представляет собой график, показывающий кривую роста опухоли мышей Balb/c, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и обработанных (раз в две недели) либо изотипическим контролем, либо антителом против PD-1. На 17-й день группа, ранее получавшая анти-PD-1 (со средним объемом опухоли ~ 800 мм^3), была разделена на две группы лечения. Группа 1 продолжала получать лечение блокадой PD-1 два раза в неделю, группа 2 получала блокаду PD-1 (два раза в неделю) вместе с DF-mIL-12-Fc si (1 мкг в неделю). ФИГ. 31B представляет собой график, показывающий кривую роста опухоли у мышей Balb/c, ранее леченных антителом против PD-1, получавших антитело против PD-1 (раз в две недели) вместе с еженедельной обработкой 1 мкг DF-mIL-12-Fc si.

[0488] Как показано на ФИГ. 31A, монотерапия анти-PD-1 не контролировала прогрессирование опухоли. Однако, как показано на ФИГ. 31B, добавление DF-mIL-12-Fc si приводило к эффективной регрессии опухоли.

Пример 18 - Местное лечение DF-mIL-12-Fc si против больших опухолей карциномы толстой кишки CT26 индуцирует абскопальные противоопухолевые ответы

[0489] Данный пример показывает, может ли лечение DF-mIL-12-Fc si индуцировать абскопальные терапевтические эффекты. Вкратце, Balb/c имплантировали подкожно клетками карциномы толстой кишки CT26-Tyrp1 как в левый ($0,8 \times 10^6$ опухолевых клеток), так и в правый ($0,4 \times 10^6$ опухолевых клеток) бок. На 13-й день после инокуляции опухоли в левую опухоль вводили либо 0,1 мкг изотипического контроля, либо 0,1 мкг DF-mIL-12-Fc si один раз в неделю в течение от 2 до 3 недель. ФИГ. 32A представляет собой график, показывающий кривую роста опухоли обработанной (Tr) опухоли у мышей Balb/c, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и обработанных один раз (еженедельно) либо изотипическим контролем, либо DF-mIL-12-Fc si. Опухоли в правом боку не лечили (NT).

[0490] ФИГ. 32B представляет собой график, показывающий кривые роста опухолей необработанных (NT) опухолей у мышей Balb/c, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrpl.

[0491] Как показано на ФИГ. 32A-32B, опухоли, обработанные контрольным изотипом, прогрессивно росли как на правом, так и на левом участках. Как показано на ФИГ. 32A-32B, DF-mIL-12-Fc si вызывал эффективные противоопухолевые ответы в локальном месте инъекции (ФИГ. 32A) и находящейся на удалении необработанной опухоли (ФИГ. 32B), что указывает на абскопальные терапевтические эффекты.

Пример 19 - Опосредованная DF-mIL-12-Fc si противоопухолевая эффективность против больших опухолей карциномы толстой кишки CT26

[0492] Данный пример показывает, что DF-mIL-12-Fc si, который включает субъединицы p40 и p35 мышиного IL-12 дикого типа, слитые с N-концом полипептидов Fc-домена мышиного IgG2a с мутациями L234A, L235A и P329G (обсуждаются в примере 2), эффективен против больших объемов опухолей.

[0493] Была протестирована опосредованная DF-mIL-12-Fc si противоопухолевая эффективность против больших опухолей карциномы толстой кишки CT26. Вкратце, мышам Balb/c подкожно вводили 10^6 клеток карциномы толстой кишки CT26-Tyrpl. На 18-й день после инокуляции опухоли, когда объем опухоли достигал 800 мм^3, мышей рандомизировали в разные группы лечения (h = 10 на группу) и вводили внутрибрюшинно

DF-mIL-12-Fc si в молярной дозе, эквивалентной 1 мкг или 2 мкг IL-12, или молярный эквивалент изотипа mIgG2a один раз или один раз в неделю.

[0494] Рост опухоли оценивали в течение 65 дней. ФИГ. 26A представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли мышей Balb/c, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и обработанных один раз (еженедельно) либо 2 мкг контроля изотипа mIgG2a, либо 1 мкг DF-mIL-12-Fc si. ФИГ. 26B представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли мышей Balb/c, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и обработанных один раз (еженедельно) либо 2 мкг контроля изотипа mIgG2a, либо 2 мкг DF-mIL-12-Fc si. ФИГ. 33A представляет собой график, показывающий кривые роста опухоли мышей Balb/c, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и обработанных один раз либо 2 мкг контрольного изотипа mIgG2a, либо 2 мкг DF-mIL-12-Fc si. ФИГ. 33B представляет собой график, показывающий средние кривые роста опухоли мышей Balb/c, инокулированных опухолевыми клетками CT26-Tyrp1 и обработанных 2 мкг контрольного изотипа mIgG2a, 1 мкг DF-mIL-12-Fc si (еженедельное введение), 2 мкг DF-mIL-12-Fc si (еженедельное введение) или 2 мкг DF-mIL-12-Fc si (однократно). На ФИГ. 26A, 26B и 33A показаны кривые роста опухоли у отдельных мышей. ФИГ. 33B показывает среднее значение для опухоли ± среднее значение стандартной ошибки.

[0495] Как показано на ФИГ. 26A, 26B и 33B, еженедельные дозы (1 мкг или 2 пг) DF-mIL-12-Fc si были эффективны в отношении контроля прогрессирования опухоли, и 100% мышей ответили на лечение DF-mIL-12-Fc si. Кроме того, как показано на ФИГ. 33A, однократная обработка 2 мкг DF-mIL-12-Fc si показала регрессию опухоли, дающую 100% ответ. Данные и фигуры, описанные в данном примере, показывают, что DF-mIL-12-Fc si не только эффективен для уменьшения большего объема опухоли CT26, но также эффективен в отношении уменьшения объема опухоли CT26 при введении в виде однократной дозы.

Пример 20 - Обработка DF-mIL-12-Fc si против меланомы B16F10 индуцирует продукцию цитокинов и хемокинов в сыворотке и опухолях

[0496] Данный пример показывает, что обработка DF-mIL-12-Fc si приводит к повышенным уровням IFN-γ, CXCL9 и CXCL10 в крови и опухолях мышей C57BL/6, несущих опухоли B16F10. Вкратце, мышам C57BL/6 подкожно вводили 10^6 клеток меланомы B16F10. На 7-й день после инокуляции опухоли (когда средний объем опухоли достигал 150 мм^3) мышей

рандомизировали (n = 8 на группу). Мышам внутрибрюшинно вводили изотипический контроль, IL-12 или DF-mIL-12-Fc, эквимолярный 1 мкг IL-12.

[0497] Через 72 часа после обработки получали и анализировали лизаты сыворотки и опухоли на экспрессию IFN-γ (ФИГ. 27A), CXCL9 (ФИГ. 27B) и CXCL10 (ФИГ. 27C) с использованием мультиплексной технологии. ФИГ. 34A-C показывают средние уровни цитокинов/хемокинов у мышей.

[0498] Как показано на ФИГ. 27A-27C, однократное введение 0,5 мкг DF-mIL-12-Fc si приводило к повышенной экспрессии IFN-γ (ФИГ. 27A), CXCL9 (ФИГ. 27B) и CXCL10 (ФИГ. 27C) в сыворотке (левая панель) и в опухолях (правая панель), тогда как лечение IL-12 оказало незначительное влияние или не оказало никакого эффекта.

Пример 21 - DF hIL-12-Fc si, имеющий мутации LALAPA и LALAPG, имеет аналогичную IFN-γ-стимулирующую активность и отменяет связывание FcyR

[0499] В данном примере показаны IFN-γ-стимулирующая и FcyR-связывающая активности DF hIL-12-Fc si с IgG1 Fc, имеющим мутации LALAPA (L234A, L235A и P329A) или мутации LALAPG (L234A, L235A и P329G). Вкратце, человеческие PBMC культивировали в течение 2 дней как с 5 пг/мл фитогемагглютинина (PHA), так и с титрованием дозы DF hIL-12-Fc-si, имеющего мутации LALAPA или LALAPG. После 2-дневной стимуляции супернатанты собирали и содержание IFNγ измеряли с помощью ELISA. Для определения активности связывания FcyR конъюгированное с флуорофором изотипное антитело hIgG1 (83 нМ), связанное с клетками THP-1, которые экспрессируют высокоаффинные FcyR CD32 и CD64, детектировали с помощью проточной цитометрии.

[0500] Как показано на ФИГ. 34A, hIL-12-Fc-LALAPA и hIL-12-Fc-LALAPG обладают сходной способностью стимулировать продукцию IFN-γ из PBMC одновременно с PHA, что намного превышает количество, продуцируемое только с PHA.

[0501] Как показано на ФИГ. 34B, одновременное включение 16-кратного молярного избытка of hIL-12-Fc-wt (1,3 мМ) в смесь с меченым антителом изотипа hIgG1 привело к значительному снижению сигнала связывания, вероятно, из-за конкуренции за связывание IgG1 с CD32 и CD64. Напротив, при той же концентрации, ни инкубация с hIL-12-Fc-LALAPA, ни инкубация с hIL-12-Fc-LALAPG не приводила к детектируемому связыванию изотипа IgG1, что свидетельствует об отмене вовлечения FcyR для обоих белков, связанных с мутациями LALAPA и LALAPG.

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0502] Раскрытые в данном документе варианты осуществления включают варианты осуществления P1-P121, как обеспечено в пронумерованных вариантах осуществления раскрытия.

[0503] Вариант осуществления P1: Гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий:

первый полипептид, содержащий первую Fc-последовательность антитела, и второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся Fc-последовательность антитела,

где первый полипептид дополнительно содержит белковую последовательность субъединицы мультисубъединичного белка,

где белковая последовательность слита линкером, содержащим аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG (SEQ ID NO: 1), с первой Fc-последовательностью антитела, где X представляет собой L или E; и

дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела, и субъединицы мультисубъединичного белка связаны друг с другом, причем первая Fc-последовательность антитела и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела, каждая, содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации,

где первая Fc-последовательность антитела и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела связаны друг с другом.

[0504] Вариант осуществления P2: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P1, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 2).

[0505] Вариант осуществления P3: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P2, в котором дополнительная субъединица многосубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность
GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3).

[0506] Вариант осуществления P4: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P3, в котором дополнительная субъединица многосубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3).

[0507] Вариант осуществления P5: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P2, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 13).

[0508] Вариант осуществления P6: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P5, в котором дополнительная субъединица многосубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 13).

[0509] Вариант осуществления P7: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P2, в котором дополнительная субъединица многосубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 14).

[0510] Вариант осуществления P8: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P7, в котором дополнительная субъединица многосубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 14).

[0511] Вариант осуществления P9: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P2-P8, в котором линкер, сливающий белковую последовательность с первой Fc-последовательностью антитела, состоит из аминокислотной последовательности RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 2).

[0512] Вариант осуществления P10: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P1, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 4).

[0513] Вариант осуществления P11: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P10, в котором дополнительная субъединица многосубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 5).

[0514] Вариант осуществления P12: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P11, в котором дополнительная субъединица многосубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 5).

[0515] Вариант осуществления P13: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P10, в котором дополнительная субъединица многосубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 63).

[0516] Вариант осуществления P14: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P13, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 63).

[0517] Вариант осуществления P15: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P10, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 64).

[0518] Вариант осуществления P16: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P15, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 64).

[0519] Вариант осуществления P17: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P10-P16, в котором линкер, сливающий белковую последовательность с первой Fc-последовательностью антитела, состоит из аминокислотной последовательности RVESKYGPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 4).

[0520] Вариант осуществления P18: Гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий:

первый полипептид, содержащий первую Fc-последовательность антитела, и второй полипептид, содержащий вторую, отличающуюся Fc-последовательность антитела,

где первый полипептид дополнительно содержит белковую последовательность субъединицы мультисубъединичного белка,

где белковая последовательность слита линкером, содержащим аминокислотную последовательность EPKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 6) или PKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 237), с первой Fc-последовательностью антитела, где X_1 представляет L или A, X_2 представляет L, E или A и X_3 представляет A или G; и

дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела, и субъединицы мультисубъединичного белка связаны друг с другом, и

где, когда X_1 представляет L и/или X_2 представляет L, по меньшей мере одна из первой Fc-последовательности антитела и второй, отличающейся Fc-последовательности антитела содержит мутацию Q347R для стимуляции гетеродимеризации,

где первая Fc-последовательность антитела и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела связаны друг с другом.

[0521] Вариант осуществления P19: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P18, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 7) или PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 238).

[0522] Вариант осуществления P20: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P19, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 8) или GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 241).

[0523] Вариант осуществления P21: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P20, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 8) или

GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 241).

[0524] Вариант осуществления P22: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P19, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSEPKS SDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 15) или

GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 242).

[0525] Вариант осуществления P23: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P22, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 15) или

GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 242).

[0526] Вариант осуществления P24: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P19, в котором дополнительная субъединица многосубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSEPKS SDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 16) или

GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 243).

[0527] Вариант осуществления P25: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P24, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 16) или

GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 243).

[0528] Вариант осуществления P26: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P19-P25, в котором линкер, сливающий белковую последовательность с первой Fc-последовательностью антитела, состоит из аминокислотной последовательности EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 7) или PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 238).

[0529] Вариант осуществления P27: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P18, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность

EPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 9) или PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239).

[0530] Вариант осуществления P28: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P27, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 10) или

GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 244).

[0531] Вариант осуществления P29: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P28, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 10) или

GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 244).

[0532] Вариант осуществления P30: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P27, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 65) или

GGGGSPKS SDKTHT CPP CPAPEAAGG (SEQ ID NO: 245).

[0533] Вариант осуществления P31: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P30, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 65) или

GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 245).

[0534] Вариант осуществления P32: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P27, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 66) или

GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 246).

[0535] Вариант осуществления P33: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P32, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности
GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 66) или
GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 246).

[0536] Вариант осуществления P34: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P27-P33, в котором линкер, сливающий белковую последовательность с первой Fc-последовательностью антитела, состоит из аминокислотной последовательности EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 9). или PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239).

[0537] Вариант осуществления P35: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P18, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 11) или PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 240).

[0538] Вариант осуществления P36: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P35, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность
GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 12) или
GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 247).

[0539] Вариант осуществления P37: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P36, в котором дополнительная субъединица многосубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности
GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 12) или
GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 247).

[0540] Вариант осуществления P38: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P35, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность
GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 67) или

GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 248).

[0541] Вариант осуществления P39: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P38, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 67) или

GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 248).

[0542] Вариант осуществления P40: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P35, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, содержащим аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 68) или

GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 249).

[0543] Вариант осуществления P41: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P40, в котором дополнительная субъединица мультисубъединичного белка слита со второй, отличающейся Fc-последовательностью антитела линкером, состоящим из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 68) или

GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 249).

[0544] Вариант осуществления P42: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P35-P41, в котором линкер, сливающий белковую последовательность с первой Fc-последовательностью антитела, состоит из аминокислотной последовательности EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 11) или PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA. (SEQ ID NO: 240).

[0545] Вариант осуществления P43: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P17, в котором первая Fc-последовательность антитела и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела представляют собой Fc-последовательности IgG4, мутированные для стимуляции гетеродимеризации друг с другом.

[0546] Вариант осуществления P44: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P43, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из K370E, R409W и их комбинации,

и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из E357N, D399V, F405T и любой их комбинации(ий).

[0547] Вариант осуществления P45: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P43, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из E357N, D399V, F405T и любой их комбинации(ий), и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из K370E, R409W и их комбинации(ий).

[0548] Вариант осуществления P46: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P43, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит мутации K370E и R409W и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит мутации E357N, D399V и F405T.

[0549] Вариант осуществления P47: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P43, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит мутации E357N, D399V и F405T и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит мутации K370E и R409W.

[0550] Вариант осуществления P48: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P43, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из K360E, R409W и их комбинации, и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из Q347R, D399V, F405T и и любой их комбинации(ий).

[0551] Вариант осуществления P49: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P43, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из Q347R, D399V, F405T и любой их комбинации(й), и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из K360E, R409W и их комбинации.

[0552] Вариант осуществления P50: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P43, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит мутации

K360E и R409W и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела, содержит мутации Q347R, D399V и F405T.

[0553] Вариант осуществления P51: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P43, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит мутации Q347R, D399V и F405T и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит мутации K360E и R409W.

[0554] Вариант осуществления P52: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления с P18 по P42, в котором первая Fc-последовательность антитела и вторая, отличающаяся от него Fc-последовательность антитела представляют собой Fc-последовательность IgG1, которые мутированы, чтобы способствовать гетеродимеризации друг с другом.

[0555] Вариант осуществления P53: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P52, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из K360E, K409W и их комбинации, и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из Q347R, D399V, F405T и и любой их комбинации(ий).

[0556] Вариант осуществления P54: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P52, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из Q347R, D399V, F405T и любой их комбинации(й), и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из K360E, K409W и их комбинации.

[0557] Вариант осуществления P55: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P52, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит мутации K360E и K409W и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит мутации Q347R, D399V и F405T.

[0558] Вариант осуществления P56: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P52, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит мутации Q347R, D399V и F405T и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит мутации K360E и K409W.

[0559] Вариант осуществления P57: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P43-P56, в котором Fc-последовательности IgG4 или IgG1 дополнительно мутированы для снижения эффекторных функций.

[0560] Вариант осуществления P58: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P57, в котором первая Fc-последовательность антитела и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела, каждая, содержат мутацию L234A, L235A или L235E и/или P329A.

[0561] Вариант осуществления P59: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P57 или варианту осуществления P58, в котором первая Fc-последовательность антитела и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела, каждая, содержат одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из G237A, A330S, P331S и и любой их комбинации(ий).

[0562] Вариант осуществления P60: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P57 или варианту осуществления P58, в котором первая Fc-последовательность антитела и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела, каждая, содержат мутации G237A, A330S и P331S.

[0563] Вариант осуществления P61: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P43-P60, в котором Fc-последовательности IgG4 или IgG1 дополнительно мутированы для введения межцепочечного дисульфидного мостика.

[0564] Вариант осуществления P62: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P61, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит мутацию Y349C и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит мутацию S354C.

[0565] Вариант осуществления P63: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P61, в котором первая Fc-последовательность антитела содержит мутацию S354C и вторая, отличающаяся Fc-последовательность антитела содержит мутацию Y349C.

[0566] Вариант осуществления P64: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P63, в котором субъединица мультисубъединичного белка является субъединицей мультисубъединичного цитокина.

[0567] Вариант осуществления P65: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P64, в котором цитокин представляет собой IL-12.

[0568] Вариант осуществления P66: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P65, дополнительно содержащий по меньшей мере один вариабельный домен антитела.

[0569] Вариант осуществления P67: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P66, где по меньшей мере одна вариабельная область тяжелой цепи антитела соединена с вариабельной областью легкой цепи антитела с образованием Fab, где Fab связан с N-концом первой Fc-последовательности антитела и/или второй, отличающейся Fc-последовательности антитела.

[0570] Вариант осуществления P68: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P67, в котором белковая последовательность субъединицы мультисубъединичного белка и дополнительной субъединицы мультисубъединичного белка соединены с C-концом первой Fc-последовательности антитела и второй, отличающейся Fc-последовательности антитела, соответственно.

[0571] Вариант осуществления P69: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P67, в котором белковая последовательность субъединицы мультисубъединичного белка и дополнительной субъединицы мультисубъединичного белка соединены с C-концом второй, отличающейся Fc-последовательности антитела и первой Fc-последовательности антитела, соответственно.

[0572] Вариант осуществления P70: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P66, в котором первый полипептид содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела, расположенный на C-конце по отношению к первой Fc-последовательности антитела.

[0573] Вариант осуществления P71: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P66 или вариантом осуществления P70, в котором второй полипептид содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела, расположенный на C-конце по отношению ко второй, отличающейся Fc-последовательности антитела.

[0574] Вариант осуществления P72: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P70 или варианту осуществления P71, в котором вариабельная область тяжелой цепи антитела соединена с вариабельной областью легкой цепи антитела с образованием scFv.

[0575] Вариант осуществления P73: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P70-72, в котором белковая последовательность субъединицы

мультисубъединичного белка и дополнительной субъединицы мультисубъединичного белка соединены с N-концом первой Fc-последовательности антитела и второй, отличающейся Fc-последовательности антитела, соответственно.

[0576] Вариант осуществления P74: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P70-P72, в котором белковая последовательность субъединицы мультисубъединичного белка и дополнительной субъединицы мультисубъединичного белка соединены с N-концом второй, отличающейся Fc-последовательности антитела и первой Fc-последовательности антитела, соответственно.

[0577] Вариант осуществления P75: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P65, не содержащий вариабельный домен антитела.

[0578] Вариант осуществления P76: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P65 или варианту осуществления P75, дополнительно содержащий протеогликан-связывающий домен.

[0579] Вариант осуществления P77: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P76, в котором протеогликан-связывающий домен связывает один или несколько протеогликанов, которые специфически экспрессируются в опухоли.

[0580] Вариант осуществления P78: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P77, в котором протеогликан-связывающий домен связывает один или несколько протеогликанов, выбранных из синдекана, серглицина, CSPG4, бетагликана, глипикана, перлекана, версикана, бревикана и небольших протеогликанов, богатых лейцином (SLRP).

[0581] Вариант осуществления P79: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P78, где SLRP выбраны из декорина, бигликана, аспорина, фибродулина и люмикана.

[0582] Вариант осуществления P80: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P65 или вариантам осуществления P75-P79, дополнительно содержащий коллаген-связывающий домен.

[0583] Вариант осуществления P81: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно варианту осуществления P80, в котором коллаген-связывающий домен связывает один или несколько коллагенов, которые специфически экспрессируются в опухоли.

[0584] Вариант осуществления P82: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P65 или P75-P81, дополнительно содержащий связывающий гиалуроновую кислоту домен.

[0585] Вариант осуществления P83: Гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P76-P82, в котором протеогликан-связывающий домен, коллаген-связывающий домен или связывающий гиалуроновую кислоту домен слит с C-концом первого полипептида Fc-домена антитела или второго полипептида Fc-домена антитела.

[0586] Вариант осуществления P84: Состав, содержащий гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из предыдущих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

[0587] Вариант осуществления P85: Клетка, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих гетеродимерный Fc-слитый белок согласно любому из вариантов осуществления P1-P83.

[0588] Вариант осуществления P86: Способ лечения рака, где способ включает введение пациенту гетеродимерного Fc-слитого белка согласно любому из вариантов осуществления P1-P83 или состава согласно варианту осуществления P84.

[0589] Вариант осуществления P87: Способ лечения острого лучевого синдрома, где способ включает введение пациенту гетеродимерного Fc-слитого белка согласно любому из вариантов осуществления P83 или состава согласно варианту осуществления P84.

[0590] Вариант осуществления P88: Способ варианта осуществления P87, в котором острый лучевой синдром включает один или несколько синдромов, выбранных из группы, состоящей из гемопоэтического лучевого синдрома, желудочно-кишечного лучевого синдрома, нейроваскулярного лучевого синдрома, кожного лучевого синдрома и любой их комбинации(й).

[0591] Вариант осуществления P89: Гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291.

[0592] Вариант осуществления P90: Полипептид, содержащий субъединицу мультисубъединичного цитокина и полипептид Fc-домена иммуноглобулина, где полипептид Fc-домена содержит мутации, способствующие гетеродимеризации с другим полипептидом Fc-домена иммуноглобулина, и одну или несколько мутаций, снижающих эффекторную функцию Fc.

[0593] Вариант осуществления P91: Полипептид согласно варианту осуществления P90, в котором Fc-домен представляет собой Fc-домен человеческого антитела IgG1.

[0594] Вариант осуществления P92: Полипептид согласно варианту осуществления P91, в котором одна или несколько мутаций, которые снижают эффекторную функцию Fc, выбраны из L234A, L235A или L235E, G237A, P329A, A330S и P331S, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

[0595] Вариант осуществления P93: Полипептид согласно варианту осуществления P91 или варианту осуществления P92, в котором мутации, снижающие эффекторную функцию Fc, представляют собой L234A, L235A и P329A, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

[0596] Вариант осуществления P94: Полипептид согласно любому из вариантов осуществления P91-P93, в котором мутации, способствующие гетеродимеризации, представляют собой K360E и K409W, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

[0597] Вариант осуществления P95: Полипептид согласно любому из вариантов осуществления P91-P93, в котором мутации, способствующие гетеродимеризации, представляют собой Q347R, D399V и F405T, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

[0598] Вариант осуществления P96: Полипептид согласно варианту осуществления P94 или P95, в котором Fc-домен дополнительно содержит мутацию, способствующую образованию дисульфидной связи с другим полипептидом Fc-домена иммуноглобулина.

[0599] Вариант осуществления P97: Полипептид согласно варианту осуществления P96, где, когда мутации гетеродимеризации представляют собой K360E и K409W, мутация, способствующая образованию дисульфидной связи, представляет собой Y349C, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EC.

[0600] Вариант осуществления P98: Полипептид согласно варианту осуществления P96, где, когда мутации гетеродимеризации представляют собой Q347R, D399V и F405T, мутация, способствующая образованию дисульфидной связи, представляет собой S354C, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EC.

[0601] Вариант осуществления P99: Полипептид согласно варианту осуществления P97, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290.

[0602] Вариант осуществления P100: Полипептид согласно варианту осуществления P98, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291.

[0603] Вариант осуществления P101: Полипептид согласно любому из вариантов осуществления P90-P100, дополнительно содержащий вариабельный домен антитела.

[0604] Вариант осуществления P102: Полипептид согласно варианту осуществления P101, в котором вариабельный домен антитела включает вариабельный домен тяжелой цепи антитела.

[0605] Вариант осуществления P103: Полипептид согласно варианту осуществления P102, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела слит с N-концом полипептида.

[0606] Вариант осуществления P104: Полипептид согласно варианту осуществления P103, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела связывает вариабельный домен легкой цепи антитела с образованием Fab.

[0607] Вариант осуществления P105: Полипептид согласно варианту осуществления P103, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела дополнительно слит с вариабельным доменом легкой цепи антитела с образованием scFv.

[0608] Вариант осуществления P106: Полипептид согласно любому из вариантов осуществления P101-P105, в котором субъединица мультисубъединичного цитокина слита с C-концом Fc-домена иммуноглобулина.

[0609] Вариант осуществления P107: Полипептид согласно варианту осуществления P101, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела слит с C-концом полипептида.

[0610] Вариант осуществления P108: Полипептид согласно варианту осуществления P107, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела дополнительно слит с вариабельным доменом легкой цепи антитела с образованием scFv.

[0611] Вариант осуществления P109: Полипептид согласно варианту осуществления P107 или P108, в котором субъединица многосубъединичного цитокина слита с N-концом Fc-домена иммуноглобулина.

[0612] Вариант осуществления P110: Полипептид согласно любому из вариантов осуществления P90-P100, не содержащий вариабельный домен антитела.

[0613] Вариант осуществления P111: Полипептид согласно любому из вариантов осуществления P90-P100 или P110, дополнительно содержащий протеогликан-связывающий домен.

[0614] Вариант осуществления P111: Полипептид согласно варианту осуществления P111, в котором протеогликан-связывающий домен связывает один или несколько протеогликанов, специфически экспрессируемых в опухоли.

[0615] Вариант осуществления P113: Полипептид согласно варианту осуществления P112, в котором протеогликан-связывающий домен связывает один или несколько протеогликанов, выбранных из синдекана, серглицина, CSPG4, бетагликана, глипикана, перлекана, версикана, бревикана и небольших богатых лейцином протеогликанов (SLRP).

[0616] Вариант осуществления P114: Полипептид согласно варианту осуществления P113, в котором SLRP выбраны из декорина, бигликана, аспорина, фибродулина и люмикана.

[0617] Вариант осуществления P115: Полипептид согласно любому из вариантов осуществления P90-P100 или 110-114, дополнительно содержащий коллаген-связывающий домен.

[0618] Вариант осуществления P116: Полипептид согласно варианту осуществления P115, в котором коллаген-связывающий домен связывает один или несколько коллагенов, специфически экспрессируемых в опухоли.

[0619] Вариант осуществления P117: Полипептид согласно любому из вариантов осуществления P90-P100 или 110-116, дополнительно содержащий связывающий гиалуроновую кислоту домен.

[0620] Вариант осуществления P118: Полипептид по любому из вариантов осуществления P111-P117, в котором протеогликан-связывающий домен, коллаген-связывающий домен или связывающий гиалуроновую кислоту домен слит с C-концом полипептида.

[0621] Вариант осуществления P119: Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290 или SEQ ID NO: 291 согласно любому из вариантов осуществления P89-P118.

[0622] Вариант осуществления P120: Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290 или SEQ ID NO: 291, согласно любому из вариантов осуществления P89-P118.

[0623] Вариант осуществления P121: Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления P119 или экспрессионный вектор согласно варианту осуществления P120.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0624] Полное раскрытие каждого из патентных документов и научных статей, упомянутых в данном документе, включено посредством ссылки для всех целей.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0625] Изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отступления от его сущности или существенных характеристик. Следовательно, вышеупомянутые варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное в данном документе.

Таким образом, объем изобретения указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в предшествующем описании, и все изменения, которые подпадают под значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, предназначены для включения в нее.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий:

(a) первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела и первую субъединицу мультисубъединичного белка; и

(b) второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка,

где первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации,

где первый и/или второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций, которые снижают эффекторную функцию Fc, и

где первая субъединица и вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка связаны друг с другом.

2. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 1, в котором эффекторная функция включает способность Fc индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (**ADCC**), антителозависимый клеточный фагоцитоз (**ADCP**) и/или комплемент-зависимую цитотоксичность (**CDC**).

3. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 1 или 2, в котором гетеродимерный Fc-слитый белок является фукозилированным.

4. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-3, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена антитела человека.

5. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-4, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD или IgE.

6. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-5, в котором первый и/или второй полипептид(ы) Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций в положении(ях) 233, 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, 329, 330 и/или 331, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

7. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-6, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG1.

8. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 7, в котором первый и/или второй полипептид(ы) Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций в положении(ях) 234, 235, 237, 329, 330 и/или 331, в соответствии с системой нумерации EC.

9. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 8, в котором первый и/или второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций, выбранных из L234A, L235A, L235E, G237A, P329A, A330S и P331S.

10. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 9, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат мутации L234A, L235A и P329A.

11. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 9, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат мутации L234A и L235A.

12. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 9, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат мутации L234A, L235E, G237A, A330S и P331S.

13. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 7-12, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию C220S.

14. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-6, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG4.

15. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 14, в котором первый и/или второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций в положении(ях) 235 и/или 329, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

16. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 15, в котором первый и/или второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций, выбранных из L235E и P329A.

17. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 16, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию L235E.

18. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 16, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L235E и P329A.

19. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 14-18, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию S228P.

20. Гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291.

21. Полипептид, содержащий субъединицу мультисубъединичного цитокина и полипептид Fc-домена иммуноглобулина, где полипептид Fc-домена содержит мутации, способствующие гетеродимеризации с другим полипептидом Fc-домена иммуноглобулина, и одну или несколько мутаций, снижающих эффекторную функцию Fc.

22. Полипептид по п. 21, в котором Fc-домен представляет собой Fc-домен человеческого IgG1- антитела.

23. Полипептид по п. 22, в котором одна или несколько мутаций, снижающих эффекторную функцию Fc, выбраны из L234A, L235A или L235E, G237A, P329A, A330S и P331S, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

24. Полипептид по п. 22 или 23, в котором мутации, снижающие эффекторную функцию Fc, представляют собой L234A, L235A и P329A, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

25. Полипептид по любому из пп. 22-24, в котором мутации, способствующие гетеродимеризации, представляют собой K360E и K409W, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

26. Полипептид по любому из пп. 22-24, в котором мутации, способствующие гетеродимеризации, представляют собой Q347R, D399V и F405T, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

27. Полипептид по п. 25 или 26, в котором Fc-домен дополнительно содержит мутацию, способствующую образованию дисульфидной связи с другим полипептидом Fc-домена иммуноглобулина.

28. Полипептид по п. 27, в котором, когда мутации, способствующие гетеродимеризации, представляют собой K360E и K409W, мутация, способствующая образованию дисульфидной связи, представляет собой Y349C, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

29. Полипептид по п. 27, в котором, когда мутации, способствующие гетеродимеризации, представляют собой Q347R, D399V и F405T, мутация, способствующая образованию дисульфидной связи, представляет собой S354C, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

30. Полипептид по п. 28, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290.

31. Полипептид по п. 29, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291.

32. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290 или SEQ ID NO: 291.

33. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290 или SEQ ID NO: 291.

34. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 32 или экспрессионный вектор по п. 33.

35. Гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий:

(a) первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела и первую субъединицу мультисубъединичного белка; и

(b) второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка,

где первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации,

где первая субъединица мультисубъединичного белка слита первым линкером с первым полипептидом Fc-домена антитела, причем первый линкер содержит первую

аминокислотную последовательность, где первая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность

PKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 237), в которой X_1 представляет L или A, X_2 представляет L, E или A и X_3 представляет A или G,

где, когда X_1 представляет L и/или X_2 представляет L, по меньшей мере один из первого полипептида Fc-домена антитела и второго полипептида Fc-домена антитела содержит мутацию Q347R, способствующую гетеродимеризации, и

где первая субъединица и вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка связаны друг с другом.

36. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 35, в котором первая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239).

37. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 36, в котором первая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239).

38. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 36 или 37, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 10).

39. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 38, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 10).

40. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 35, в котором первая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 238).

41. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 40, в котором первая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 238).

42. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 40 или 41, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 8).

43. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 42, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 8).

44. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 40 или 41, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 15).

45. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 44, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 15).

46. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 40 или 41, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 16).

47. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 46, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 16).

48. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 40 или 41, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 65).

49. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 48, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 65).

50. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 40 или 41, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 66).

51. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 50, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 66).

52. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 35, в котором первая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 240).

53. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 52, в котором первая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 240).

54. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 52 или 53, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 12).

55. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 54, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 12).

56. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 52 или 53, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 67).

57. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 56, где вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 67).

58. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 52 или 53, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 68).

59. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 58, где вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 68).

60. Гетеродимерный Fc-слитый белок, содержащий:

(a) первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела и первую субъединицу мультисубъединичного белка; и

(b) второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела и вторую, отличающуюся субъединицу мультисубъединичного белка,

где первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации,

где первая субъединица мультисубъединичного белка слита первым линкером с первым полипептидом Fc-домена антитела, причем первый линкер содержит первую

аминокислотную последовательность, где первая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность

RVESKY GPPCPPCPAPEFXGG (SEQ ID NO: 1), в которой X представляет собой L или E, и

где первая субъединица и вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка связаны друг с другом.

61. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 60, в котором первая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 2).

62. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 61, в котором первая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 2).

63. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 61 или 62, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3).

64. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 63, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3).

65. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 61 или 62, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность GGGGS RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 13).

66. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 65, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 13).

67. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 61 или 62, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 14).

68. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 67, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 14).

69. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 60, в котором первая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 4).

70. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 69, в котором первая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 4).

71. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 69 или 70, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 5).

72. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 71, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности

GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 5).

73. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 69 или 70, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 63).

74. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 73, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 63).

75. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 69 или 70, в котором вторая, отличающаяся субъединица многосубъединичного белка слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность

GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 64).

76. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 75, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 64).

77. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 35-76, в котором первый и/или второй полипептид(ы) содержит (содержат) одну или несколько мутаций, которые снижают эффекторную функцию Fc.

78. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 77, в котором эффекторная функция включает способность Fc индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (**ADCC**), антителозависимый клеточный фагоцитоз (**ADCP**) и/или комплементзависимую цитотоксичность (**CDC**).

79. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 77 или 78, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG1.

80. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 79, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат одну или несколько мутаций, выбранных из L234A, L235A или L235E, G237A, P329A, A330S и P331S, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

81. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 80, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L234A, L235A и P329A.

82. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 80, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L234A и L235A.

83. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 80, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L234A, L235E, G237A, A330S и P331S.

84. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 79-83, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию C220S.

85. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 77 или 78, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG4.

86. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 85, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат одну или несколько мутаций, выбранных из L235E и P329A, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

87. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 86, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию L235E.

88. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 86, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L235E и P329A.

89. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 85-88, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию S228P.

90. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп.7-13, 35-59 и 79-84, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из K360E, K409W и их комбинации, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из Q347R, D399V, F405T и любой их комбинации.

91. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 90, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит мутации K360E и K409W, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит мутации Q347R, D399V и F405T.

92. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп.7-13, 35-59 и 79-84, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из Q347R, D399V, F405T и любой их комбинации(й), и второй

полипептид Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из K360E, K409W и их комбинации.

93. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 92, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит мутации Q347R, D399V и F405T, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит мутации K360E и K409W.

94. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 14-19, 60-76 и 85-89, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из K370E, R409W и их комбинации, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из E357N, D399V, F405T и любой их комбинации.

95. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 94, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит мутации K370E и R409W, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит мутации E357N, D399V и F405T.

96. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 14-19, 60-76 и 85-89, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из E357N, D399V, F405T и любой их комбинации, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из K370E, R409W и их комбинации.

97. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 96, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит мутации E357N, D399V и F405T, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит мутации K370E и R409W.

98. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 14-19, 60-76 и 85-89, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из K360E, R409W и их комбинации, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из Q347R, D399V, F405T и любой их комбинации.

99. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 98, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит мутации K360E и R409W, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит мутации Q347R, D399V и F405T.

100. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 14-19, 60-76 и 85-89, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из Q347R, D399V, F405T и любой их комбинации, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из K360E, R409W и их комбинации.

101. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 100, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит мутации Q347R, D399V и F405T, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит мутации K360E и R409W.

102. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп.1-19 или 35-101, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела дополнительно мутированы для введения межцепочечной дисульфидной связи.

103. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 102, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит мутацию Y349C, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит мутацию S354C.

104. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 102, в котором первый полипептид Fc-домена антитела содержит мутацию S354C, и второй полипептид Fc-домена антитела содержит мутацию Y349C.

105. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-19 или 35-104, в котором мультисубъединичный белок представляет собой мультисубъединичный цитокин.

106. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 105, в котором мультисубъединичный цитокин представляет собой IL-12.

107. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 106, в котором первая субъединица мультисубъединичного цитокина представляет собой субъединицу p40 человеческого IL-12 и вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного цитокина представляет собой субъединицу p35 человеческого IL-12.

108. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 106, в котором первая субъединица мультисубъединичного цитокина представляет собой субъединицу p35 человеческого IL-12 и вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного цитокина представляет собой субъединицу p40 человеческого IL-12.

109. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 107 или 108, в котором C74, соответствующий последовательности p35 дикого типа, замещен серином, и C177, соответствующий последовательности p40 дикого типа, замещен серином, где замены удаляют нативную дисульфидную связь, которая образуется между субъединицами p35 и p40 человеческого IL-12 дикого типа.

110. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 109, в котором субъединица p35 человеческого IL-12 содержит замену V185C и субъединица p40 человеческого IL-12 содержит замену Y292C, которые образуют ненативную дисульфидную связь между субъединицей p35 и субъединицей p40 человеческого IL-12.

111. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-19 или 35-110, дополнительно содержащий вариабельный домен антитела.

112. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 111, в котором вариабельный домен антитела включает вариабельный домен тяжелой цепи антитела.

113. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 112, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела слит с N-концом первого полипептида Fc-домена антитела или второго полипептида Fc-домена антитела.

114. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из 113, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела связывает вариабельный домен легкой цепи антитела с образованием Fab.

115. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 113, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела дополнительно слит с вариабельным доменом легкой цепи антитела с образованием scFv.

116. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 113-115, в котором первая и вторая, отличающаяся субъединица мультисубъединичного белка слиты с C-концом первого полипептида Fc-домена антитела и с C-концом второго полипептида Fc-домена антитела, соответственно.

117. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 112, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела слит с C-концом первого полипептида Fc-домена антитела или второго полипептида Fc-домена антитела.

118. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 117, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела дополнительно слит с вариабельным доменом легкой цепи антитела с образованием scFv.

119. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 117 или 118, в котором первая субъединица и вторая, отличающаяся субъединицы мультисубъединичного белка слиты с N-концом первого полипептида Fc-домена антитела и N-концом второго полипептида Fc-домена антитела, соответственно.

120. Полипептид по любому из пп. 21-31, дополнительно содержащий вариабельный домен антитела.

121. Полипептид по п. 120, в котором вариабельный домен антитела включает вариабельный домен тяжелой цепи антитела.

122. Полипептид по п. 121, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела слит с N-концом полипептида.

123. Полипептид по любому из 122, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела связывает вариабельный домен легкой цепи антитела с образованием Fab.

124. Полипептид по п. 122, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела дополнительно слит с вариабельным доменом легкой цепи антитела с образованием scFv.

125. Полипептид по любому из пп. 122-124, в котором субъединица мультисубъединичного цитокина слита с C-концом Fc-домена иммуноглобулина.

126. Полипептид по п. 121, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела слит с C-концом полипептида.

127. Полипептид по п. 126, в котором вариабельный домен тяжелой цепи антитела дополнительно слит с вариабельным доменом легкой цепи антитела с образованием scFv.

128. Полипептид по п. 126 или 127, в котором субъединица многосубъединичного цитокина слита с N-концом Fc-домена иммуноглобулина.

129. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-19 или 35-110, не содержащий вариабельный домен антитела.

130. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-19, 35-110 или 129, дополнительно содержащий протеогликан-связывающий домен.

131. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 130, в котором протеогликан-связывающий домен связывает один или несколько протеогликанов, специфически экспрессируемых в опухоли.

132. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 131, в котором протеогликан-связывающий домен связывает один или несколько протеогликанов, выбранных из синдекана, серглицина, CSPG4, бетагликана, глипикана, перлекана, версикана, бревикана и небольших протеогликанов, богатых лейцином (SLRP).

133. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 132, в котором SLRP выбраны из декорина, бигликана, аспорина, фибродулина и люмикана.

134. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-19, 35-110 или 129-133, дополнительно содержащий коллаген-связывающий домен.

135. Гетеродимерный Fc-слитый белок по п. 134, в котором коллаген-связывающий домен связывает один или несколько коллагенов, специфически экспрессируемых в опухоли.

136. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-19, 35-110 или 129-135, дополнительно содержащий связывающий гиалуроновую кислоту домен.

137. Гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 130-136, в котором протеогликан-связывающий домен, коллаген-связывающий домен или связывающий гиалуроновую кислоту домен слит с С-концом первого полипептида Fc-домена антитела или вторым полипептидом Fc-домена антитела.

138. Полипептид по любому из пп. 21-31, не содержащий вариабельный домен антитела.

139. Полипептид по любому из пп. 21-31, дополнительно содержащий протеогликан-связывающий домен.

140. Полипептид по п. 139, в котором протеогликан-связывающий домен связывает один или несколько протеогликанов, специфически экспрессируемых в опухоли.

141. Полипептид по п. 140, в котором протеогликан-связывающий домен связывает один или несколько протеогликанов, выбранных из синдекана, серглицина, CSPG4, бетагликана, глипикана, перлекана, версикана, бревикана и малых протеогликанов, богатых лейцином (SLRP).

142. Полипептид по п. 141, где SLRP выбраны из декорина, бигликана, аспорина, фибродулина и люмикана.

143. Полипептид по любому из пп. 21-31 или 138-142, дополнительно содержащий коллаген-связывающий домен.

144. Полипептид по п. 143, в котором коллагенсвязывающий домен связывает один или несколько коллагенов, специфически экспрессируемых в опухоли.

145. Полипептид по любому из пп. 21-31 или 138-144, дополнительно содержащий связывающий гиалуроновую кислоту домен.

146. Полипептид по любому из пп. 139-145, в котором протеогликан-связывающий домен, коллаген-связывающий домен или связывающий гиалуроновую кислоту домен слит с С-концом полипептида.

147. Состав, содержащий гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-20, 35-119 или 129-137 и фармацевтически приемлемый носитель.

148. Клетка, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-20, 35-119 или 129-137, или полипептид по любому из пп. 120-128 или 138-146.

149. Способ лечения рака, включающий введение пациенту гетеродимерного Fc-слитого белка по любому из пп. 1-20, 35-119 или 129-137, или состава по п. 147.

150. Способ лечения острого лучевого синдрома, включающий введение пациенту гетеродимерного Fc-слитого белка по любому из пп.1-20, 35-119 или 129-137, или состава по п. 147.

151. Способ по п. 150, в котором острый лучевой синдром включает один или несколько синдромов, выбранных из синдрома гематопоэтического излучения, желудочно-кишечного лучевого синдрома, нейроваскулярного лучевого синдрома, кожного лучевого синдрома и любой их комбинации(й).

152. Способ по п. 149, дополнительно включающий введение пациенту второго терапевтического средства, выбранного из: ингибитора контрольных точек, цитокина, агониста TLR, агониста STING, химиотерапевтического средства, противоопухолевого средства направленного действия, онколитического вируса, вакцины, облучения,

адоптивной NK-терапии, терапии трансплантацией стволовых клеток (SCT), агонистического антитела, терапии Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR), мультиспецифического связывающего белка (TriNKET) и средства, которое вызывает клеточное старение.

153. Способ по п. 152, в котором ингибитор контрольных точек выбран из: антитела против PD1, антитела против PD-L1, антитела против CTLA4, антитела против KIR, антитела против NKG2A, антитела против LAG3 и антитела против TIM3.

154. Способ по п. 152, в котором агонист TLR выбран из агониста TLR7, агониста TLR8, агониста TLR7/8, агониста TLR9, агониста TLR4 и агониста TLR3.

155. Способ по п. 152, в котором агонист STING представляет собой ADU-S100.

156. Способ по п. 152, в котором химиотерапевтическое средство представляет собой паклитаксел, наб-паклитаксел, доксорубицин, гемцитабин или циклофосфамид.

157. Способ по п. 152, в котором ингибитор контрольных точек выбран из:

ниволумаба, пембролизумаба, атезолизумаба, дурвалумаба, авелумаба, ипилимумаба, тремелимумаба, лирилумаба и монализумаба.

158. Способ по п. 152, в котором агонист TLR выбран из:

R848/резиквимода, VTX-2337, имиквимода и олигодезоксинуклеотида CpG.

159. Способ по п. 152, в котором агонистическое антитело выбрано из антитела против 4-IBB/CD137, антитела против OX40, антитела против CD40, антитела против CD40L, антитела против GITR и антитела против CD27.

160. Способ по п. 152, в котором цитокин выбран из IL-2, IL-15, CXCL9 и CXCL10.

161. Способ по п. 152, в котором мультиспецифический связывающий белок (TriNKET) включает:

(a) первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий сайт, который связывает опухоль-ассоциированный антиген; и

(c) домен Fc антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16;

где опухоль-ассоциированный антиген выбран из группы, состоящей из EpCAM, CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD-L1.

162. Способ по любому из пп. 149 или 152-161, в котором гетеродимерный Fc-слитый белок по любому из пп. 1-20, 35-119 или 129-137 или состав по п. 147 вводят пациенту внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно или внутриопухолево.

163. Способ по любому из пп. 149 или 152-162, в котором рак выбран из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза, В-клеточной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака груди, колоректального рака, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, рака пищевода, саркомы Юинга, фолликулярной лимфомы, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта, глиобластомы, рака головы и шеи, меланомы, мезотелиомы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, почечно-клеточной карциномы, нейробластомы, немелкоклеточного рака легких, нейроэндокринных опухолей, рака яичников и рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, саркомы, мелкоклеточного рака легких, Т-клеточной лимфомы, рака яичка, карциномы тимуса, рака щитовидной железы, уротелиального рака, видов рака с инфильтрацией миелоидными супрессорными клетками, видов рака с отложением во внеклеточном матриксе, видов рака с высоким уровнем реактивной стромы и видов рака с неоангиогенезом.

164. Способ лечения рака, включающий введение пациенту только однократной дозы гетеродимерного IL-12-Fc-слитого белка.

165. Способ по п. 164, в котором однократная доза находится в количестве, достаточном для индукции полного ответа на рак.

166. Способ по п. 165, в котором однократная доза находится в количестве, достаточном для отсрочки или предотвращения рецидива рака.

167. Способ по любому из пп. 164-166, где гетеродимерный IL-12-Fc-слитый белок содержит

(a) первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела и первую субъединицу IL-12; и

(b) второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела и вторую, отличающуюся субъединицу IL-12, причем первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации,

где первая субъединица IL-12 слита первым линкером с первым полипептидом Fc-домена антитела, причем первый линкер содержит первую аминокислотную последовательность, где первая аминокислотная последовательность включает PKSSDKTHTCPPCPAPE$X_1X_2GX_3$ (SEQ ID NO: 237), в которой X_1 представляет L или A, X_2 представляет L, E или A и X_3 представляет A или G,

где, когда X_1 представляет L и/или X_2 представляет L, по меньшей мере один из первого полипептида Fc-домена антитела и второго полипептида Fc-домена антитела содержит мутацию Q347R, способствующую гетеродимеризации, и

где первая субъединица и вторая, отличающаяся субъединица IL-12 связаны друг с другом.

168. Способ по п. 167, в котором первая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239).

169. Способ по п. 168, в котором первая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 239).

170. Способ по п. 168 или 169, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 10).

171. Способ по п. 170, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 10).

172. Способ по п. 167 или 168, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 65).

173. Способ по п. 172, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 65).

174. Способ по п. 167 или 168, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 66).

175. Способ по п. 174, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO: 66).

176. Способ по п. 167, в котором первая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 238).

177. Способ по п. 176, в котором первая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 238).

178. Способ по п. 176 или 177, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 8).

179. Способ по п. 178, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 8).

180. Способ по п. 176 или 177, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 15).

181. Способ по п. 180, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 15).

182. Способ по п. 176 или 177, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 16).

183. Способ по п. 182, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 16).

184. Способ по п. 167, в котором первая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 240).

185. Способ по п. 184, в котором первая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 240).

186. Способ по п. 184 или 185, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 12).

187. Способ по п. 186, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 12).

188. Способ по п. 184 или 185, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSEPKS SDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 67).

189. Способ по п. 188, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSEPKS SDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 67).

190. Способ по п. 184 или 185, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 68).

191. Способ по п. 190, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO: 68).

192. Способ по любому из пп. 164-166, в котором гетеродимерный IL-12-Fc-слитый белок содержит

(a) первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела и первую субъединицу IL-12; и

(b) второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела и вторую, отличающуюся субъединицу IL-12,

где первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации,

где первая субъединица IL-12 слита с первым полипептидом Fc-домена антитела первым линкером, содержащего первую аминокислотную последовательность, где первая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG (SEQ ID NO: 1), в которой X представляет L или E, и

где первая субъединица и вторая, отличающаяся субъединица IL-12 связаны друг с другом.

193. Способ по п. 192, в котором первая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 2).

194. Способ по п. 193, в котором первая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 2).

195. Способ по п. 193 или 194, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3).

196. Способ по п. 195, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 3).

197. Способ по п. 193 или 194, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 13).

198. Способ по п. 197, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 13).

199. Способ по п. 193 или 194, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 14).

200. Способ по п. 199, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO: 14).

201. Способ по п. 192, в котором первая аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 4).

202. Способ по п. 201, в котором первая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 4).

203. Способ по п. 201 или 202, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую

аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 5).

204. Способ по п. 203, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCP APEFEGG (SEQ ID NO: 5).

205. Способ по п. 201 или 202, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 63).

206. Способ по п. 205, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 63).

207. Способ по п. 201 или 202, в котором вторая, отличающаяся субъединица IL-12 слита со вторым полипептидом Fc-домена антитела вторым линкером, содержащим вторую аминокислотную последовательность, и где вторая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 64).

208. Способ по п. 207, в котором вторая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (SEQ ID NO: 64).

209. Способ по любому из пп. 164-166, в котором гетеродимерный IL-12-Fc-слитый белок содержит

(a) первый полипептид, содержащий первый полипептид Fc-домена антитела и первую субъединицу IL-12; и

(b) второй полипептид, содержащий второй полипептид Fc-домена антитела и вторую, отличающуюся субъединицу IL-12,

где первый и второй полипептиды Fc-домена антитела содержат разные мутации, способствующие гетеродимеризации,

где первый и/или второй полипептиды Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций, которые снижают эффекторную функцию Fc, и

где первая субъединица и вторая, отличающаяся субъединица IL-12 связаны друг с другом.

210. Способ по п. 209, в котором эффекторная функция включает способность Fc индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (**ADCC**), антителозависимый клеточный фагоцитоз (**ADCP**) и/или комплементзависимую цитотоксичность (**CDC**).

211. Способ по п. 209 или 210, в котором гетеродимерный Fc-слитый белок является фукозилированным.

212. Способ по любому из пп. 209-211, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена антитела человека.

213. Способ по любому из пп. 209-212, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD или IgE.

214. Способ по п. 213, в котором первый и/или второй полипептиды содержат одну или несколько мутаций в положении(ях) 233, 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, 329, 330 и/или 331, где нумерация соответствует системе нумерации EC.

215. Способ по любому из пп. 209-214, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG1.

216. Способ по п. 215, в котором первый и/или второй полипептид(ы) Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций в положении(ях) 234, 235, 237, 329, 330 и/или 331, в соответствии с системой нумерации EC.

217. Способ по п. 216, в котором первый и/или второй полипептид(ы) Fc-домена антитела содержат одну или несколько мутаций, выбранных из L234A, L235A, L235E, G237A, P329A, A330S и P331S.

218. Способ по п. 217, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L234A, L235A и P329A.

219. Способ по п. 217, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L234A и L235A.

220. Способ по п. 217, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L234A, L235E, G237A, A330S и P331S.

221. Способ по любому из пп. 215-220, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию C220S.

222. Способ по любому из пп. 209-214, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела представляют собой полипептиды Fc-домена человеческого IgG4.

223. Способ по п. 222, в котором первый и/или второй полипептид(ы) Fc-домена антитела содержит (содержат) одну или несколько мутаций в положении(ях) 235 и/или 329, пронумерованных в соответствии с нумерацией системы EC.

224. Способ по п. 223, в котором первый и/или второй полипептид(ы) Fc-домена антитела содержит (содержат) одну или несколько мутаций, выбранных из L235E и P329A.

225. Способ по п. 223, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию L235E.

226. Способ по п. 223, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутации L235E и P329A.

227. Способ по любому из пп. 222-226, в котором первый и второй полипептиды Fc-домена антитела, каждый, содержат мутацию S228P.

228. Способ по любому из пп. 164-166 или 209-219, в котором гетеродимерный IL-12-Fc-слитый белок содержит первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и второй, отличающийся полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291.

229. Способ по любому из пп. 164-166 или 209-219, в котором гетеродимерный IL-12-Fc-слитый белок содержит первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 291, и второй, отличающийся полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290.

230. Способ по любому из пп. 164-229, в котором гетеродимерный IL-12-Fc-слитый белок вводят пациенту внутриопухолево, подкожно, внутрибрюшинно или внутривенно.

231. Способ по п. 230, в котором гетеродимерный IL-12-Fc-слитый белок вводят пациенту внутриопухолево.

232. Способ по любому из пп. 164-231, дополнительно включающий введение пациенту второго терапевтического средства, выбранного из: ингибитора контрольных точек, цитокина, агониста TLR, агониста STING, химиотерапевтического средства, противоопухолевого средства направленного действия, онколитического вируса, вакцины, облучения, адоптивной NK-терапии, терапии трансплантацией стволовых клеток (SCT), агонистического антитела, терапии Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR), мультиспецифического связывающего белка (TriNKET) и средства, которое вызывает клеточное старение.

233. Способ по п. 232, в котором ингибитор контрольных точек выбран из: антитела против PD1, антитела против PD-L1, антитела против CTLA4, антитела против KIR, антитела против NKG2A, антитела против LAG3 и антитела против TIM3.

234. Способ по п. 232, в котором агонист TLR выбран из агониста TLR7, агониста TLR8, агониста TLR7/8, агониста TLR9, агониста TLR4 и агониста TLR3.

235. Способ по п. 232, в котором агонист STING представляет собой ADU-S100.

236. Способ по п. 232, в котором химиотерапевтическое средство представляет собой паклитаксел, наб-паклитаксел, доксорубицин, гемцитабин или циклофосфамид.

237. Способ по п. 232, в котором ингибитор контрольных точек выбран из: ниволумаба, пембролизумаба, атезолизумаба, дурвалумаба, авелумаба, ипилимумаба, тремелимумаба, лирилумаба и монализумаба.

238. Способ по п. 232, в котором агонист TLR выбран из: R848/резиквимода, VTX-2337, имиквимода и олигодезоксинуклеотида CpG.

239. Способ по п. 232, в котором агонистическое антитело выбрано из антитела против 4-IBB/CD137, антитела против OX40, антитела против CD40, антитела против CD40L, антитела против GITR и антитела против CD27.

240. Способ по п. 232, в котором цитокин выбран из IL-2, IL-15, CXCL9 и CXCL10.

241. Способ по п. 232, в котором мультиспецифический связывающий белок (TriNKET) содержит:

(a) первый антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D;

(b) второй антигенсвязывающий сайт, который связывает опухоль-ассоциированный антиген; и

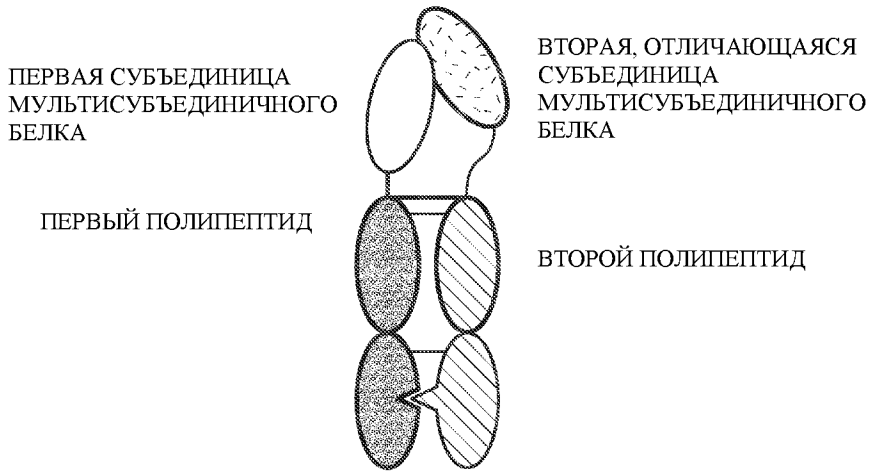
(c) Fc-домен антитела или его часть, достаточную для связывания CD16, или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16;

где опухоль-ассоциированный антиген выбран из группы, состоящей из EpCAM, CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD-L1.

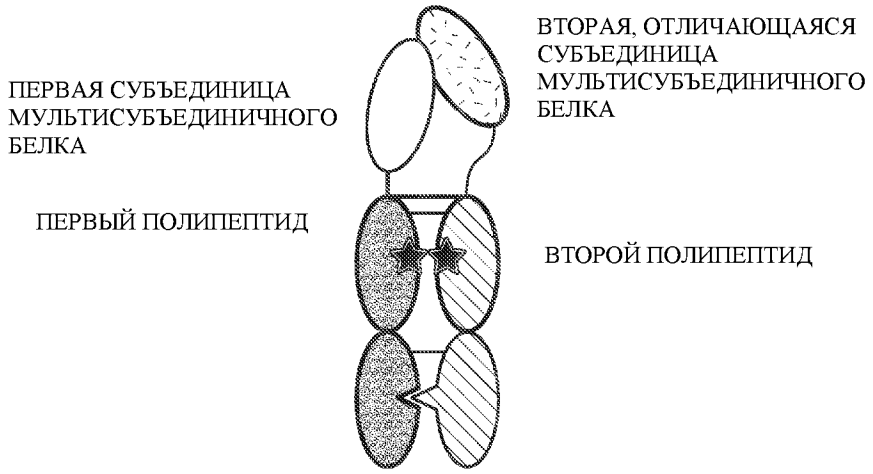
242. Способ по любому из пп. 164-241, в котором рак выбран из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза, В-клеточной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака груди, колоректального рака, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, рака пищевода, саркомы Юинга, фолликулярной лимфомы, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта, глиобластомы, рака головы и шеи, меланомы, мезотелиомы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, почечно-клеточной карциномы, нейробластомы, немелкоклеточного рака легких, нейроэндокринных опухолей, рака яичников и рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, саркомы, мелкоклеточного рака легких, Т-клеточной лимфомы, рака яичка, карциномы тимуса, рака щитовидной железы, уротелиального рака, видов рака с инфильтрацией миелоидными супрессорными клетками, видов рака с отложением во внеклеточном матриксе, видов рака с высоким уровнем реактивной стромы и видов рака с неоангиогенезом.

243. Способ по любому из пп. 149 или 152-242, в котором рак представляет собой метастатический рак.

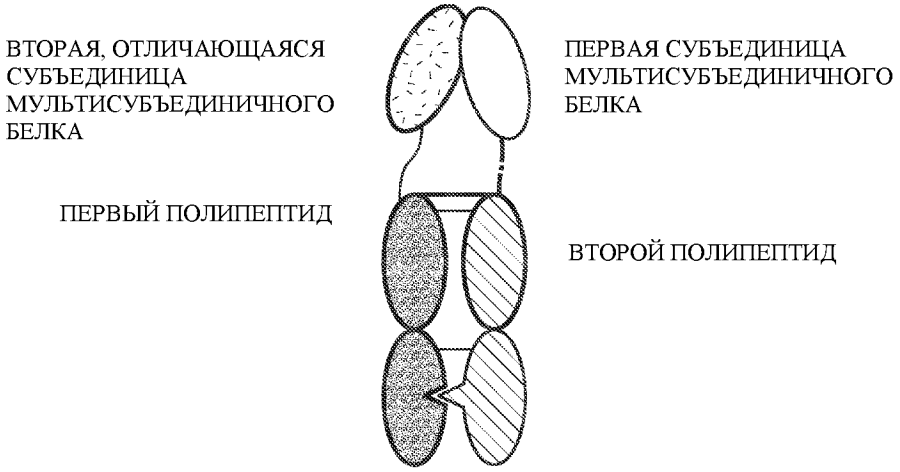
244. Способ по п. 243, в котором метастатический рак представляет собой местный, региональный или отдаленный метастатический рак.


ПЕРВАЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ВТОРАЯ, ОТЛИЧАЮЩАЯСЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
ВТОРОЙ ПОЛИПЕПТИД

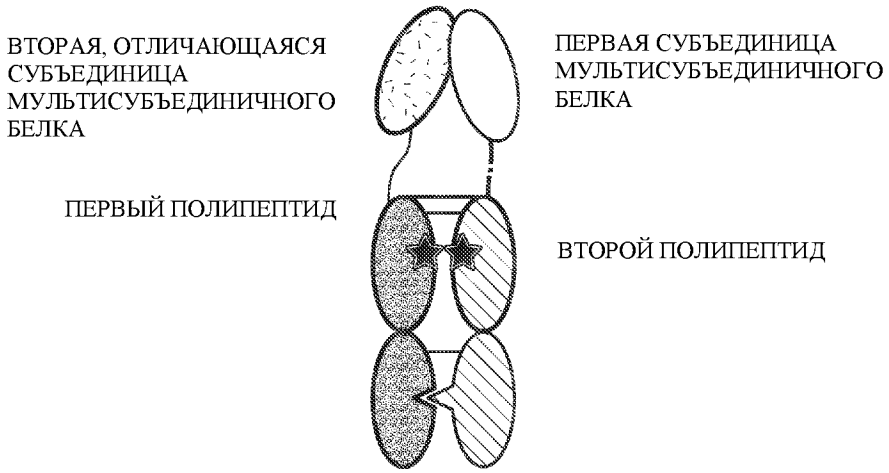
ФИГ. 1A


ПЕРВАЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ВТОРАЯ, ОТЛИЧАЮЩАЯСЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
ВТОРОЙ ПОЛИПЕПТИД

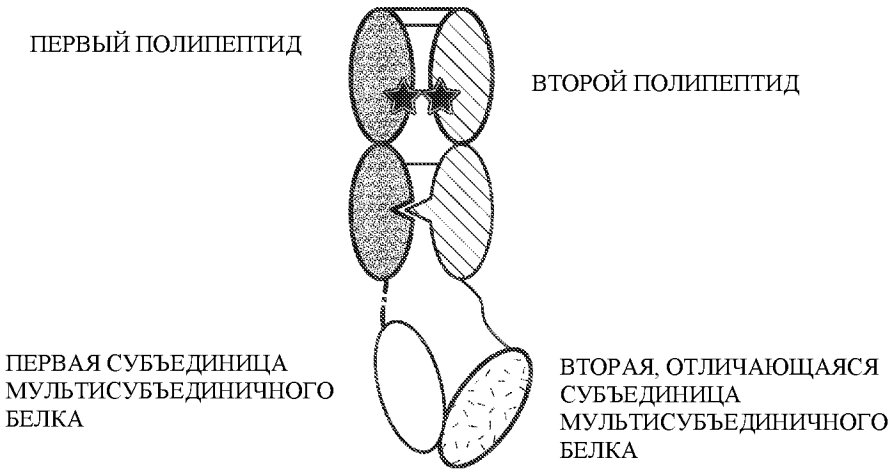
ФИГ. 1B


ВТОРАЯ, ОТЛИЧАЮЩАЯСЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ПЕРВАЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
ВТОРОЙ ПОЛИПЕПТИД

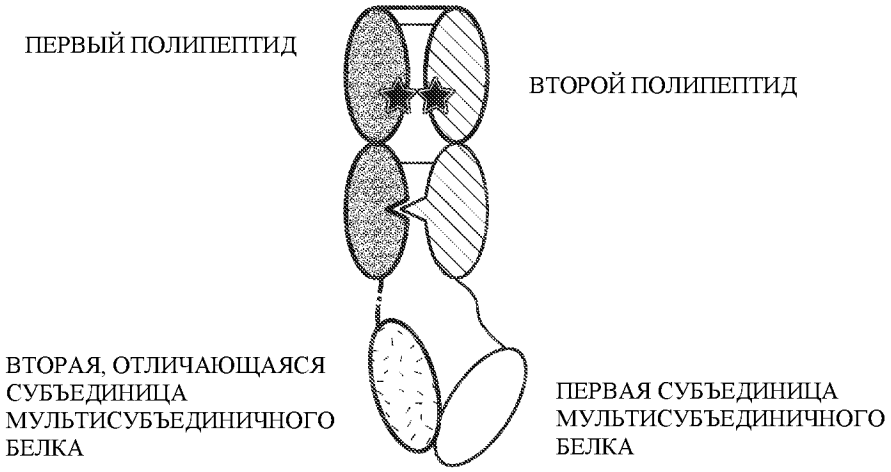
ФИГ. 1C


ВТОРАЯ, ОТЛИЧАЮЩАЯСЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ПЕРВАЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
ВТОРОЙ ПОЛИПЕПТИД

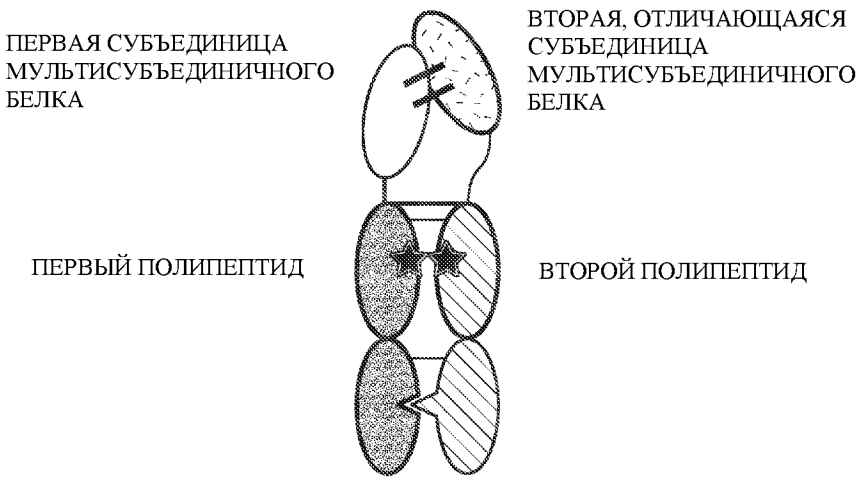
ФИГ. 1D


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
ВТОРОЙ ПОЛИПЕПТИД
ПЕРВАЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ВТОРАЯ, ОТЛИЧАЮЩАЯСЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА

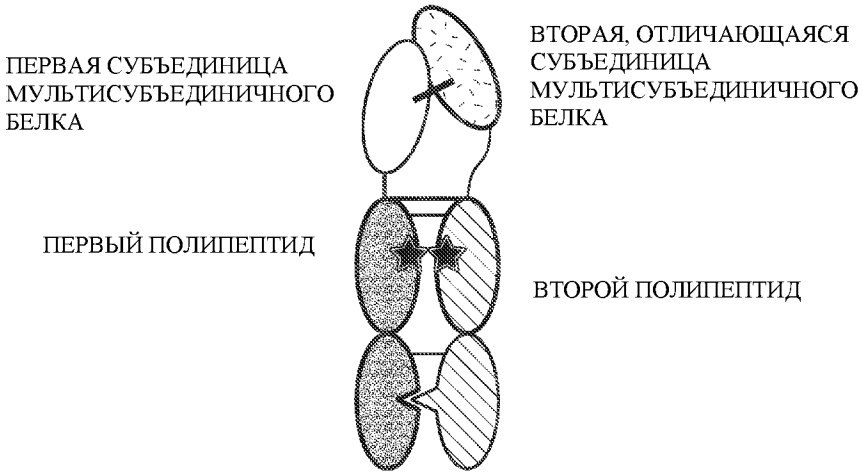
ФИГ. 1E


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
ВТОРОЙ ПОЛИПЕПТИД
ВТОРАЯ, ОТЛИЧАЮЩАЯСЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ПЕРВАЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА

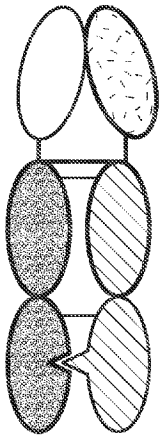
ФИГ. 1F


ПЕРВАЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ВТОРАЯ, ОТЛИЧАЮЩАЯСЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
ВТОРОЙ ПОЛИПЕПТИД

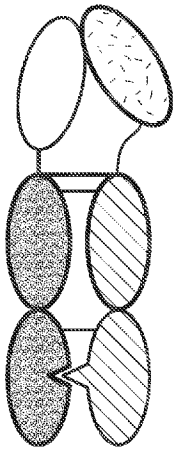
ФИГ. 2A


ПЕРВАЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ВТОРАЯ, ОТЛИЧАЮЩАЯСЯ СУБЪЕДИНИЦА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНОГО БЕЛКА
ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
ВТОРОЙ ПОЛИПЕПТИД

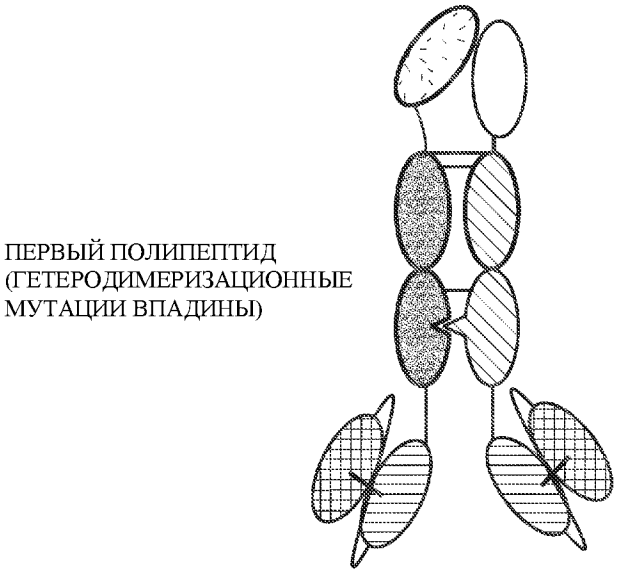
ФИГ. 2B


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
ВТОРОЙ ПОЛИПЕПТИД

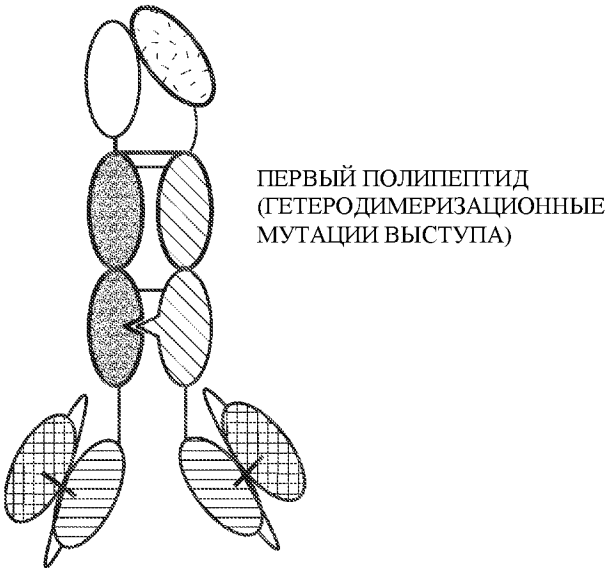
ФИГ. 3А


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
ВТОРОЙ ПОЛИПЕПТИД

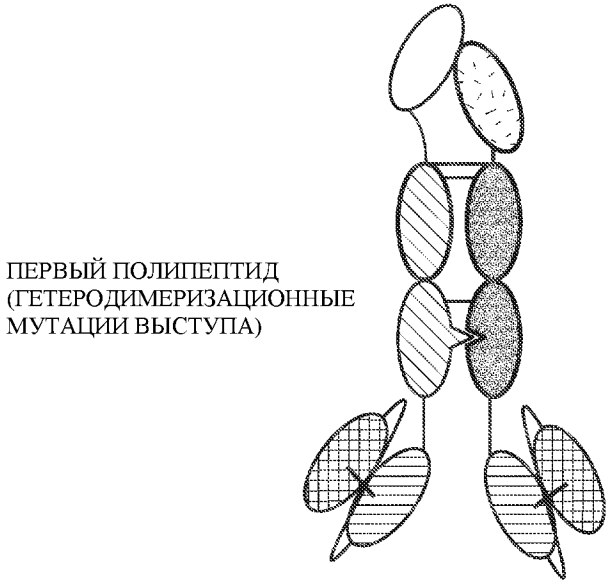
ФИГ. 3В


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
(ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ ВПАДИНЫ)

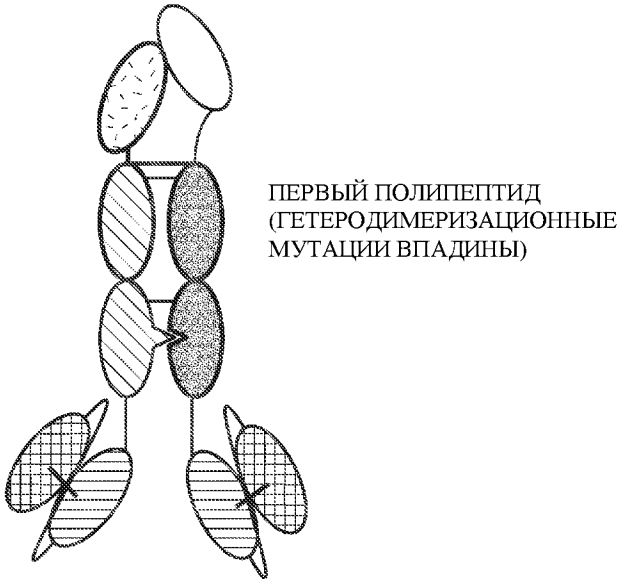
ФИГ. 4A


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
(ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ ВЫСТУПА)

ФИГ. 4B


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
(ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ ВЫСТУПА)

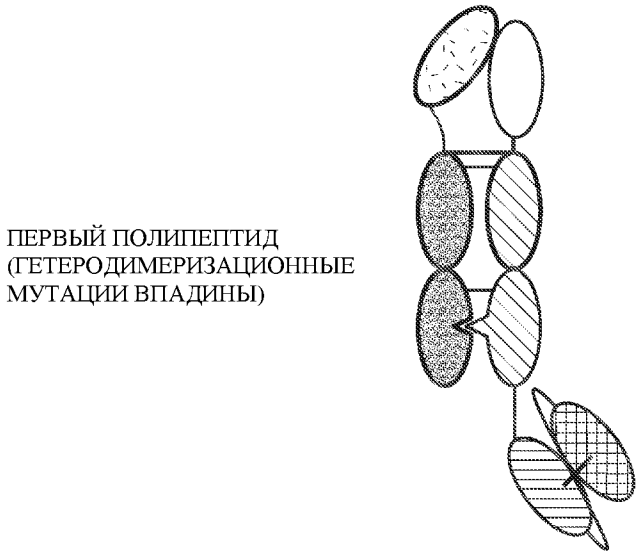
ФИГ. 4C


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
(ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ ВПАДИНЫ)

ФИГ. 4D

ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
(ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ ВПАДИНЫ)

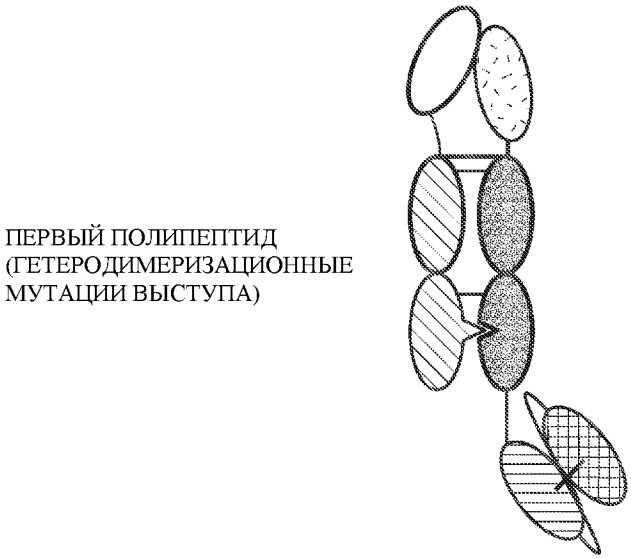
ФИГ. 4E


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
(ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ ВПАДИНЫ)

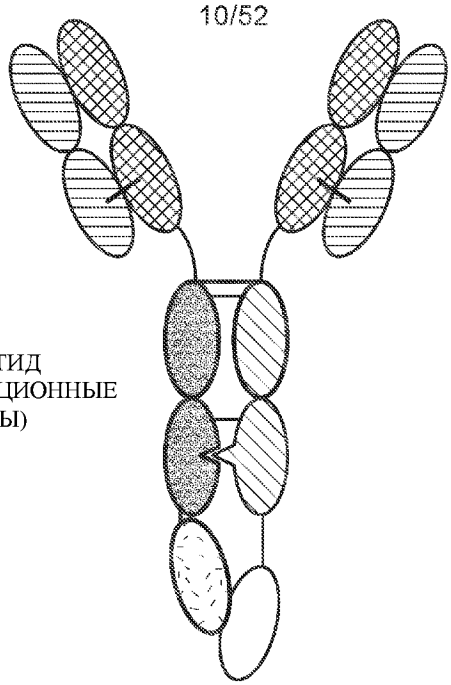
ФИГ. 4F

ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
(ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ ВЫСТУПА)

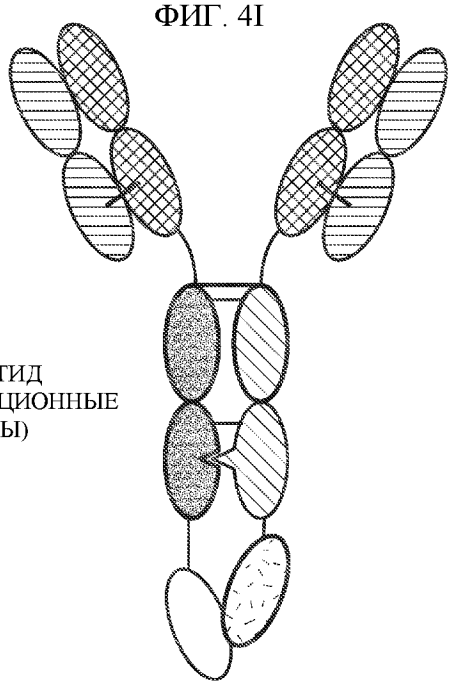
ФИГ. 4G


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
(ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ ВЫСТУПА)

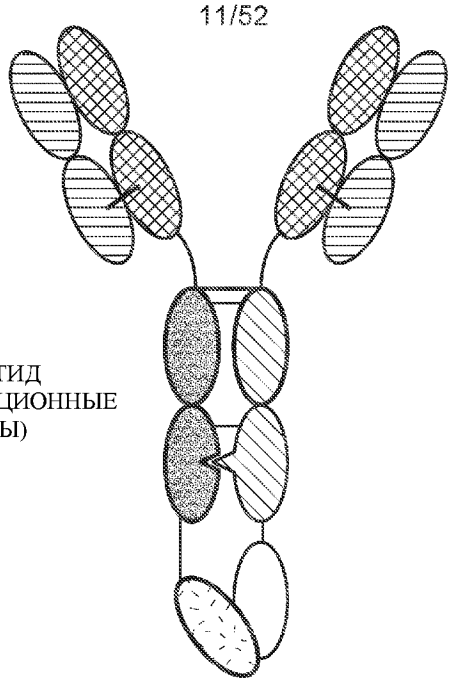
ФИГ. 4H


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
(ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ ВПАДИНЫ)

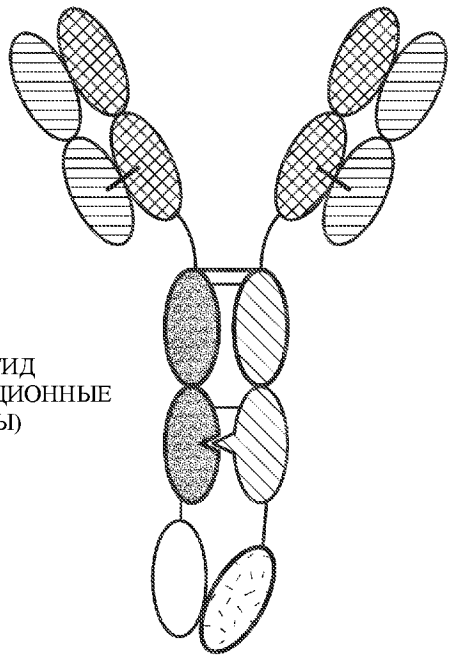
ФИГ. 4I


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
(ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ ВПАДИНЫ)

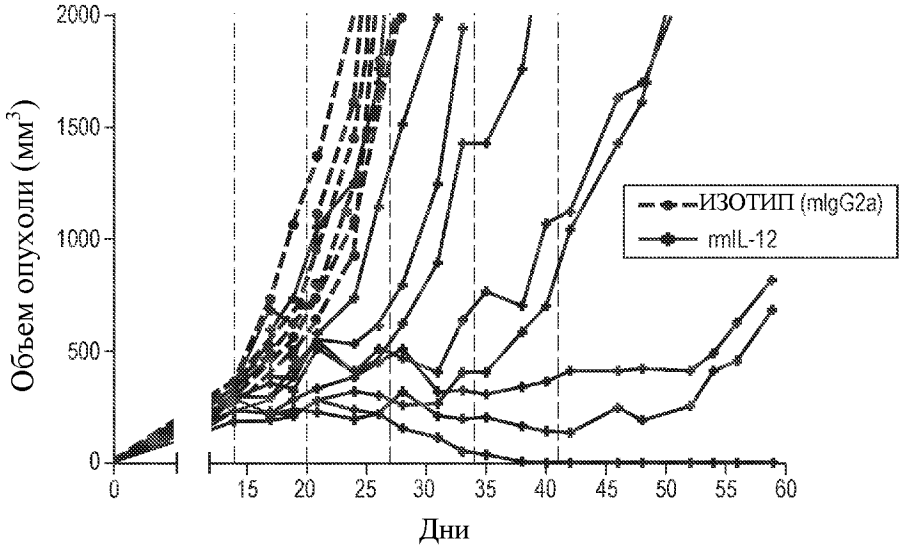
ФИГ. 4J


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
(ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ ВПАДИНЫ)

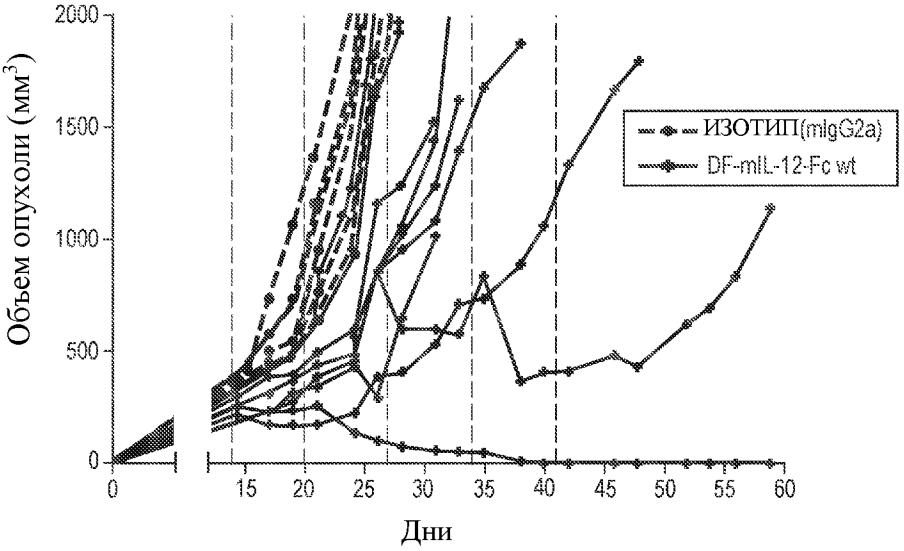
ФИГ. 4K


ПЕРВЫЙ ПОЛИПЕПТИД
(ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ ВПАДИНЫ)

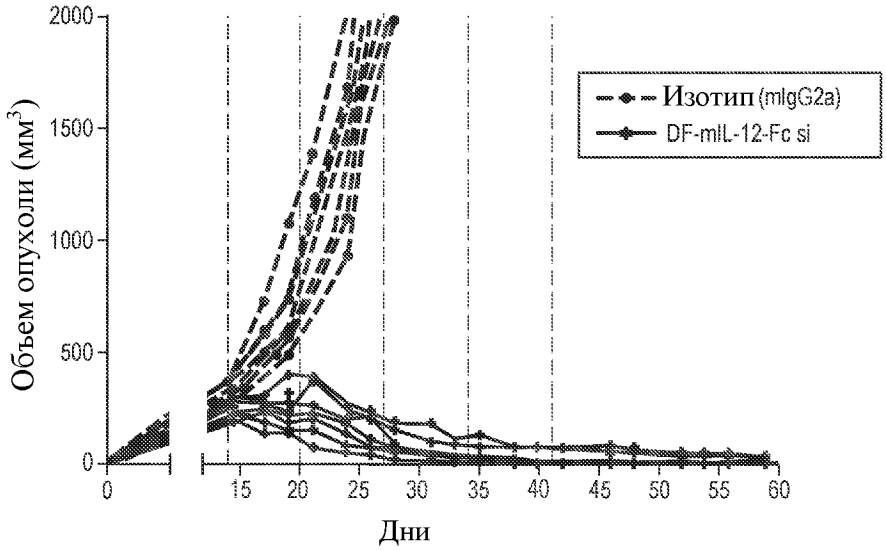
ФИГ. 4L


Объем опухоли (мм^3)
2000
1500
1000
500
0
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Дни
ИЗОТИП (mIgG2a)
mIL-12

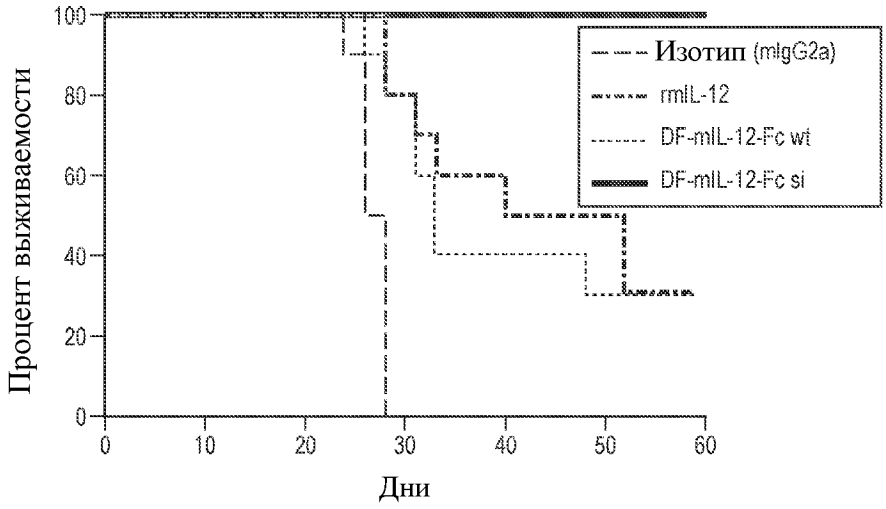
ФИГ. 5А


Объем опухоли (мм^3)
2000
1500
1000
500
0
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Дни
ИЗОТИП(mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc wt

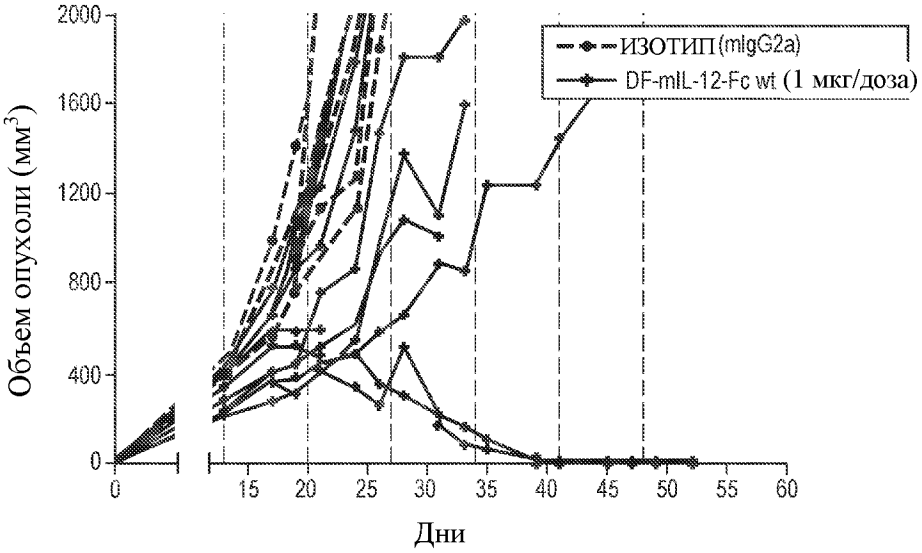
ФИГ. 5В


Объем опухоли (мм^3)
2000
1500
1000
500
0
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Дни
Изотип (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc si

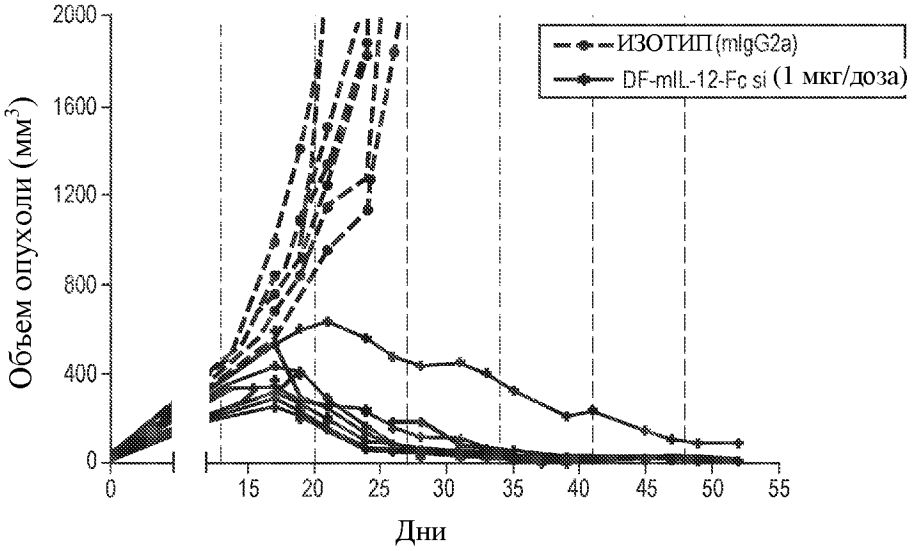
ФИГ. 5C


Процент выживаемости
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
Дни
Изотип (mIgG2a)
rmIL-12
DF-mIL-12-Fc wt
DF-mIL-12-Fc si

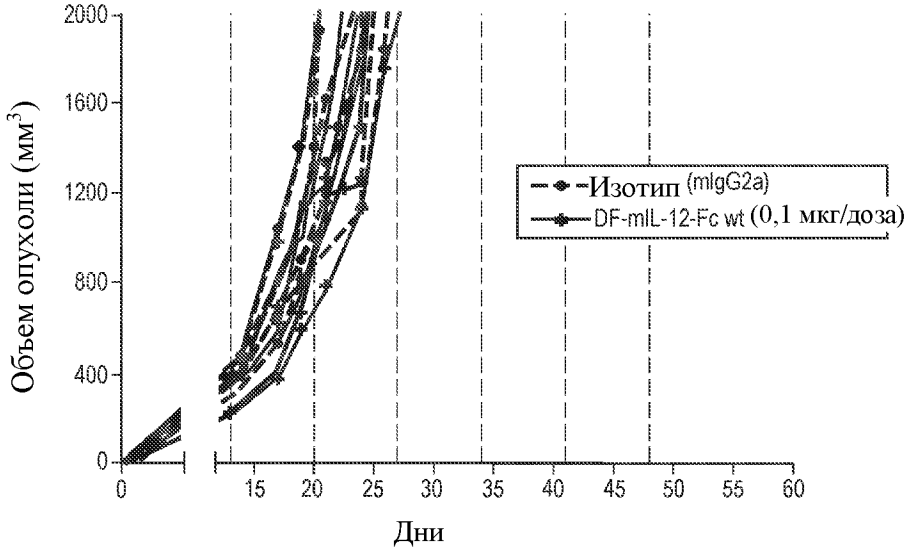
ФИГ. 6


ИЗОТИП (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc wt (1 мкг/доза)
Объем опухоли (мм^3)
2000
1600
1200
800
400
0
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Дни

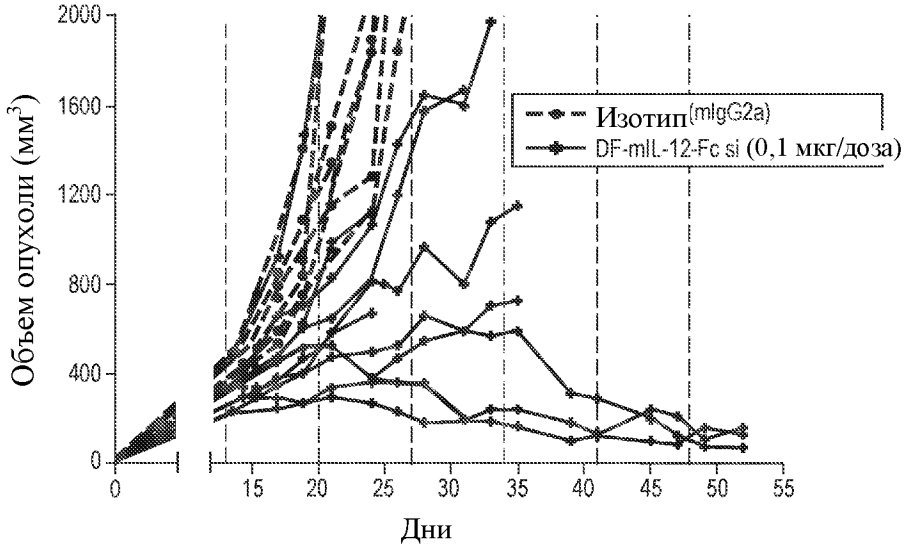
ФИГ. 7А


ИЗОТИП (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc si (1 мкг/доза)
Объем опухоли (мм^3)
2000
1600
1200
800
400
0
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Дни

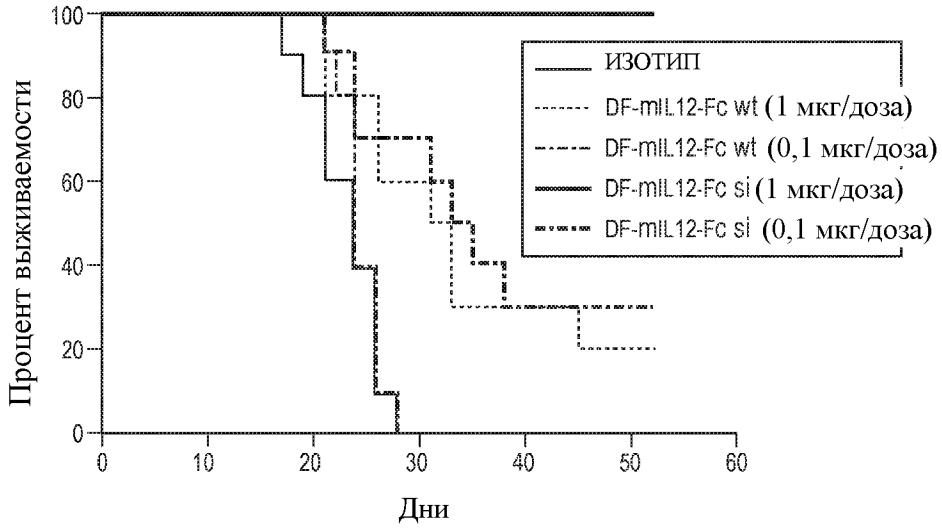
ФИГ. 7В


Объем опухоли (мм^3)
2000
1600
1200
800
400
0
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Дни
Изотип (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc wt (0,1 мкг/доза)

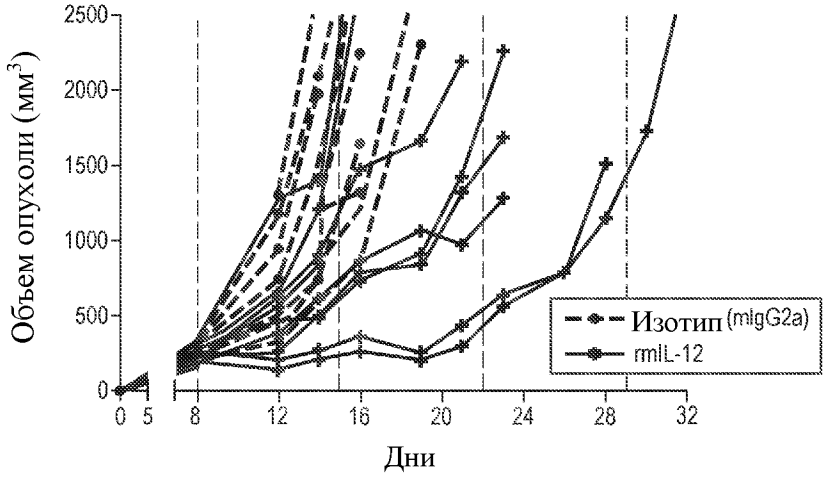
ФИГ. 7C


Объем опухоли (мм^3)
2000
1600
1200
800
400
0
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Дни
Изотип (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc si (0,1 мкг/доза)

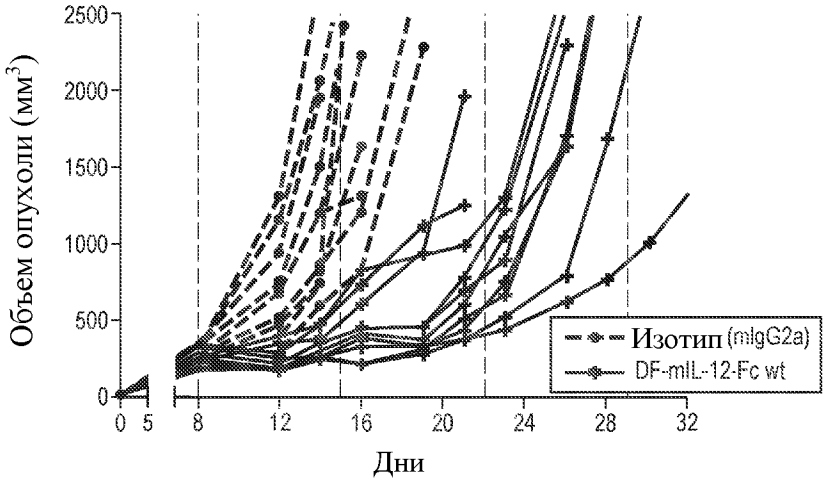
ФИГ. 7D


100
80
60
40
20
0
Процент выживаемости
0
10
20
30
40
50
60
Дни
ИЗОТИП
DF-mIL12-Fc wt (1 мкг/доза)
DF-mIL12-Fc wt (0,1 мкг/доза)
DF-mIL12-Fc si (1 мкг/доза)
DF-mIL12-Fc si (0,1 мкг/доза)

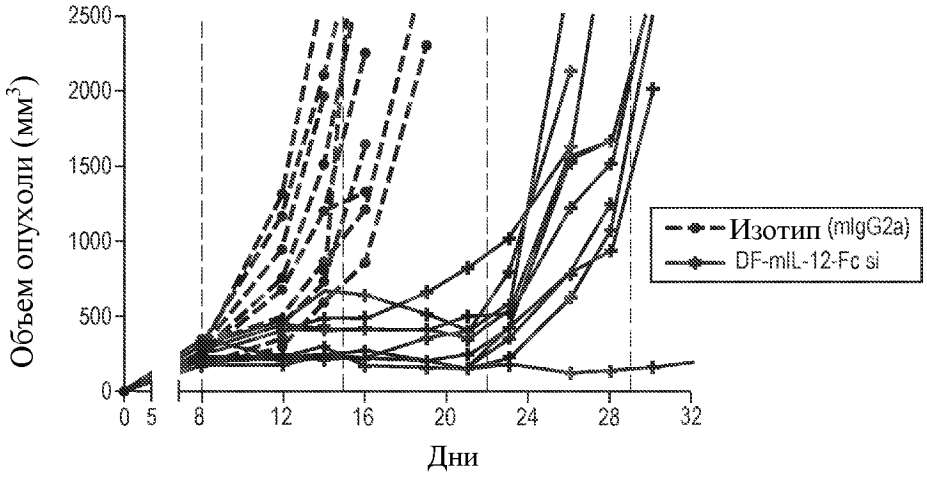
ФИГ. 8


Объем опухоли (мм^3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5 8 12 16 20 24 28 32
Дни
Изотип (mIgG2a)
rmIL-12

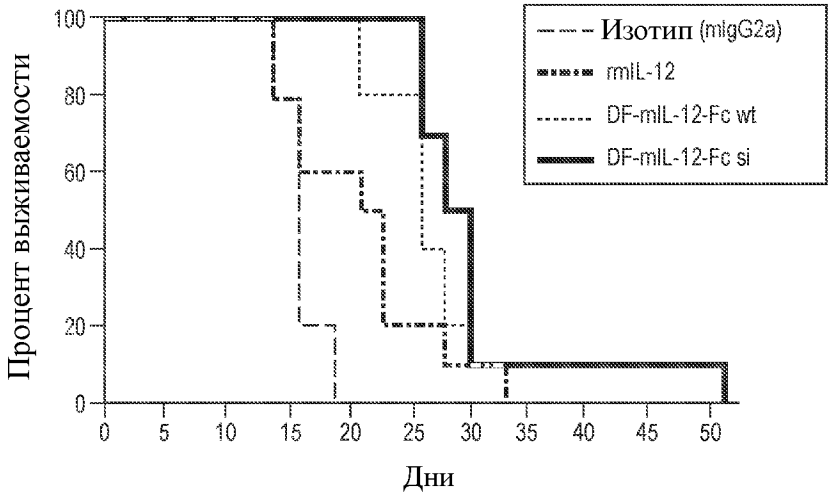
ФИГ. 9А


Объем опухоли (мм^3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5 8 12 16 20 24 28 32
Дни
Изотип (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc wt

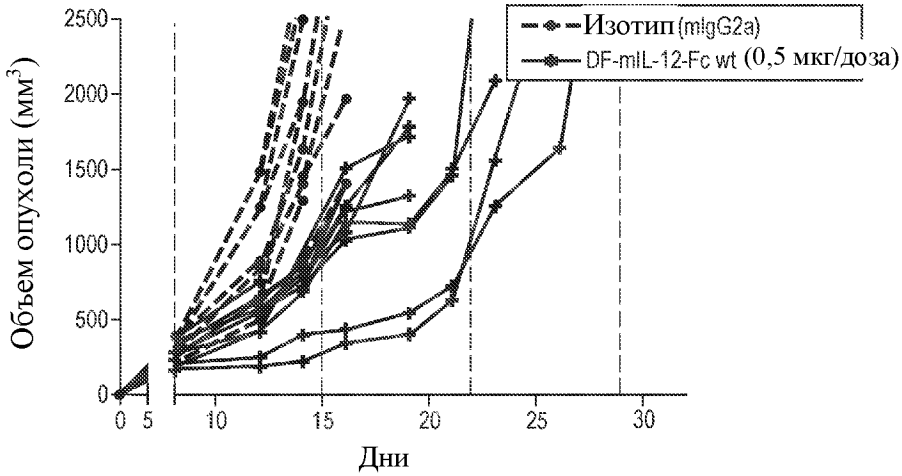
ФИГ. 9В


Объем опухоли (мм^3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5 8 12 16 20 24 28 32
Дни
Изотип (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc si

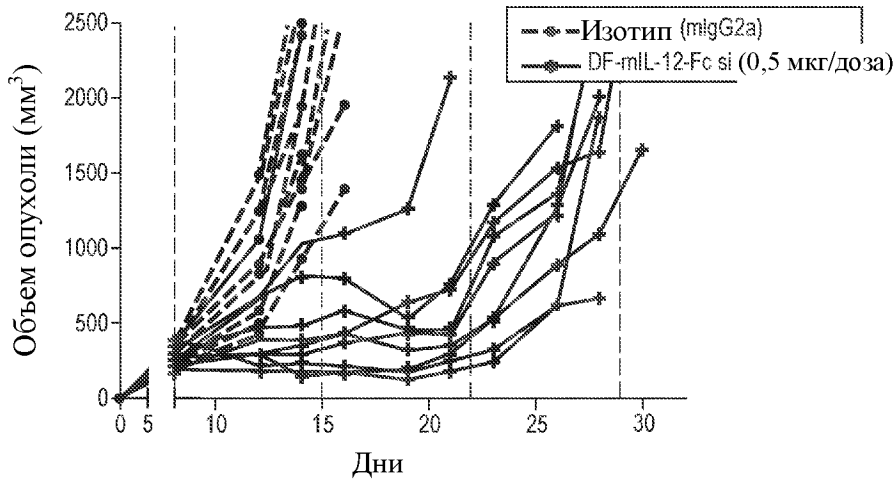
ФИГ. 9С


Процент выживаемости
100
80
60
40
20
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
Дни
Изотип (mIgG2a)
rmIL-12
DF-mIL-12-Fc wt
DF-mIL-12-Fc si

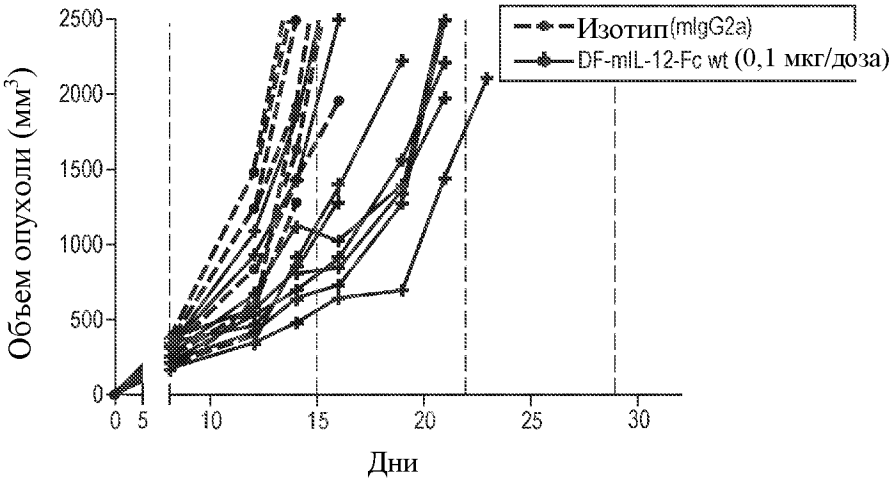
ФИГ. 10



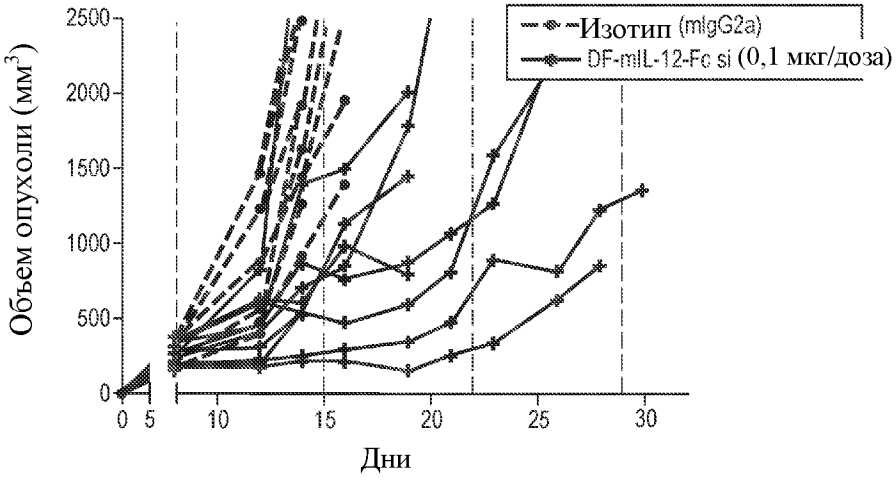
ФИГ. 11А



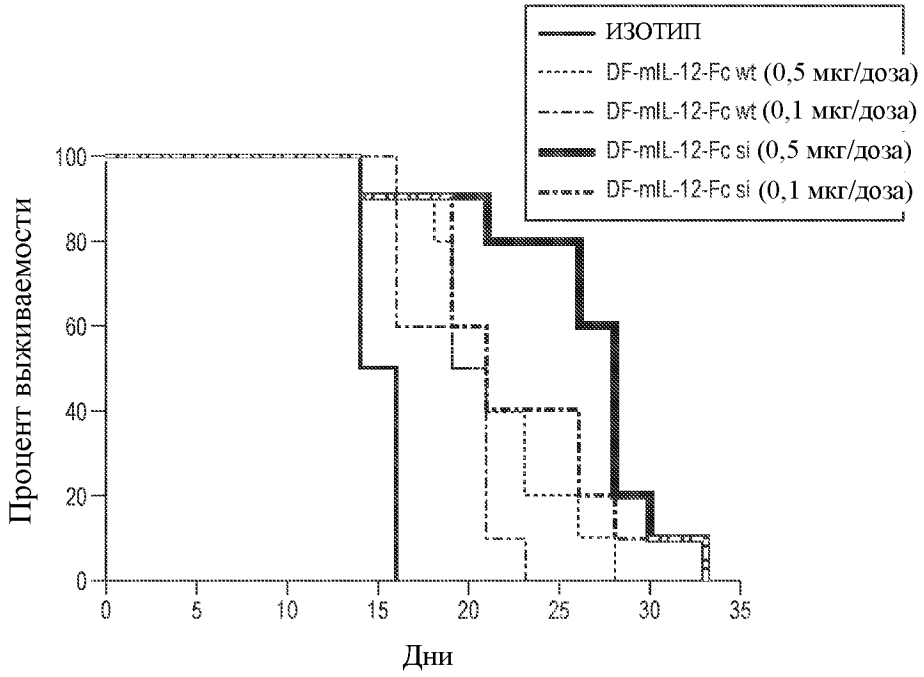
ФИГ. 11В



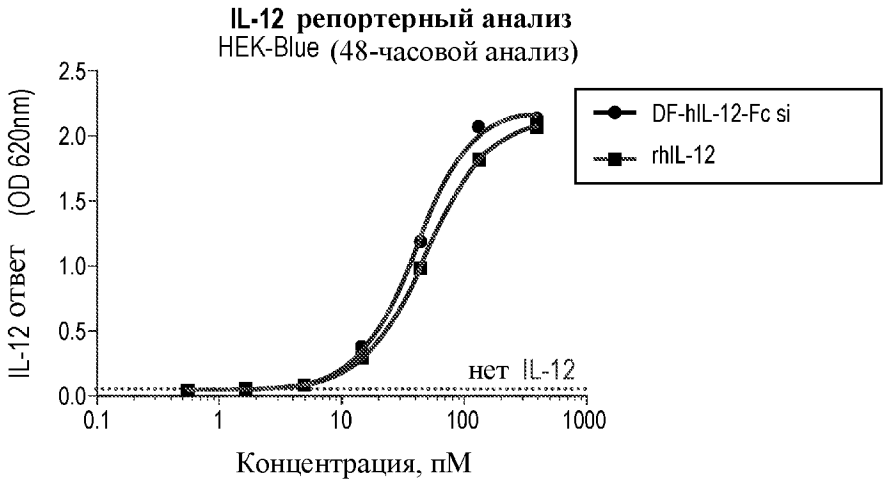
ФИГ. 11C



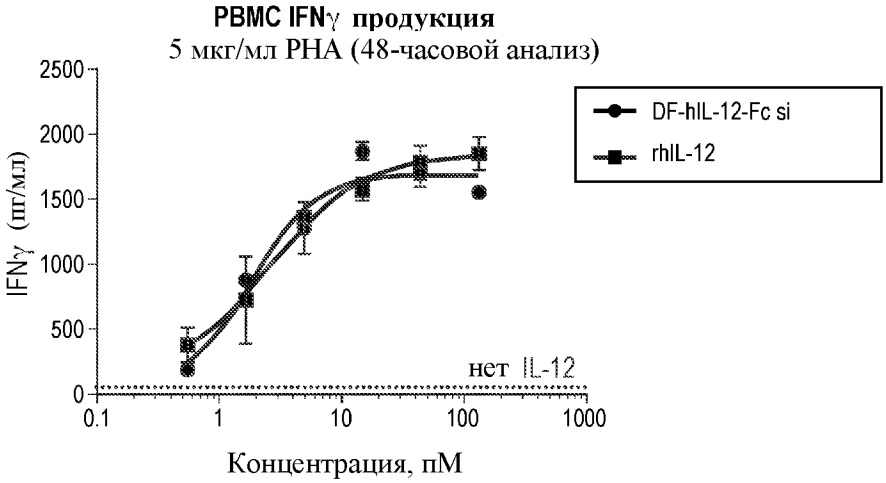
ФИГ. 11D


ИЗОТИП
DF-mIL-12-Fc wt (0,5 мкг/доза)
DF-mIL-12-Fc wt (0,1 мкг/доза)
DF-mIL-12-Fc si (0,5 мкг/доза)
DF-mIL-12-Fc si (0,1 мкг/доза)
Процент выживаемости
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Дни

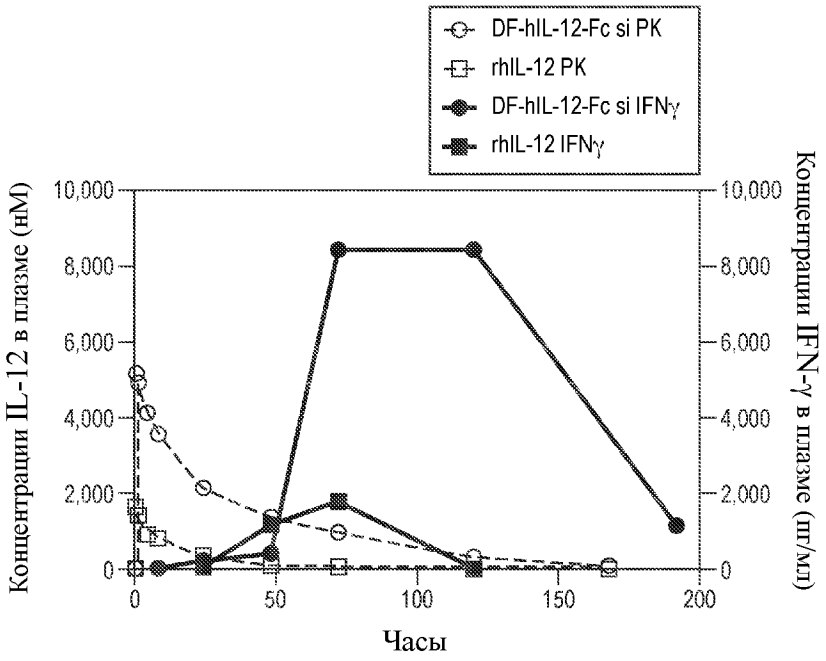
ФИГ. 12



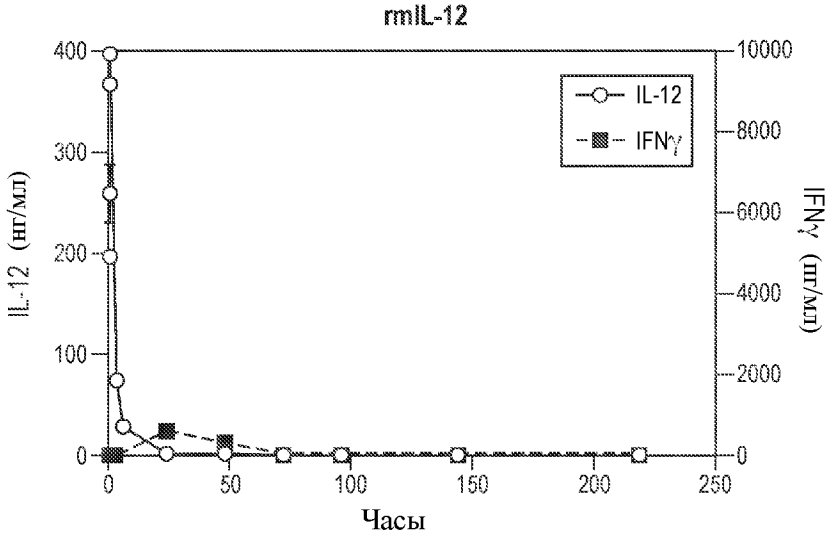
ФИГ. 13A



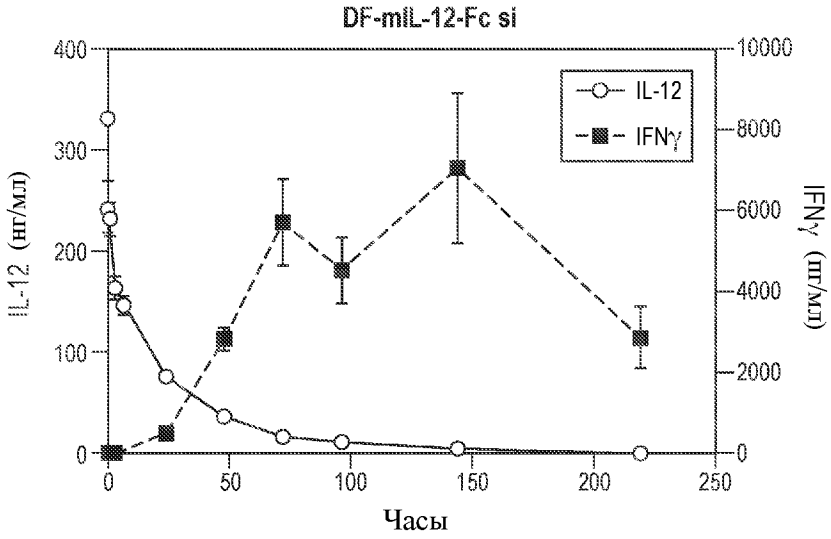
ФИГ. 13B


DF-hIL-12-Fc si PK
rhIL-12 PK
DF-hIL-12-Fc si IFNγ
rhIL-12 IFNγ
Концентрации IL-12 в плазме (нМ)
Концентрации IFN-γ в плазме (пг/мл)
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
0
50
100
150
200
Часы

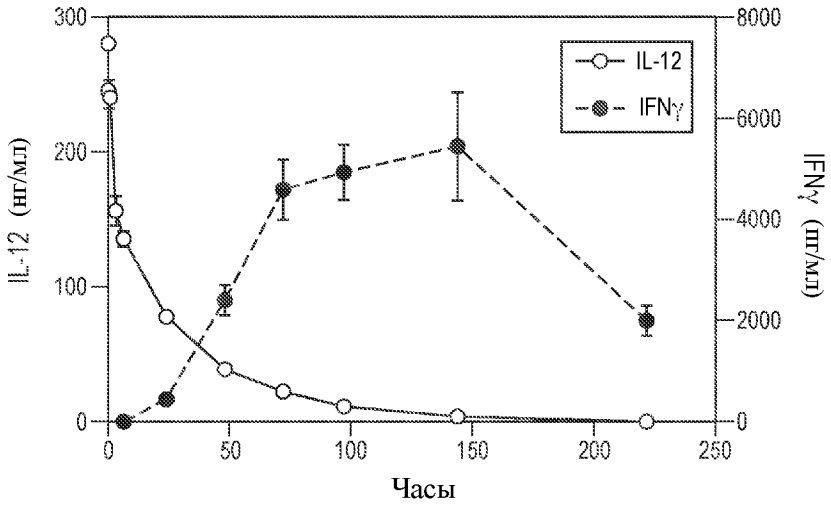
ФИГ. 14



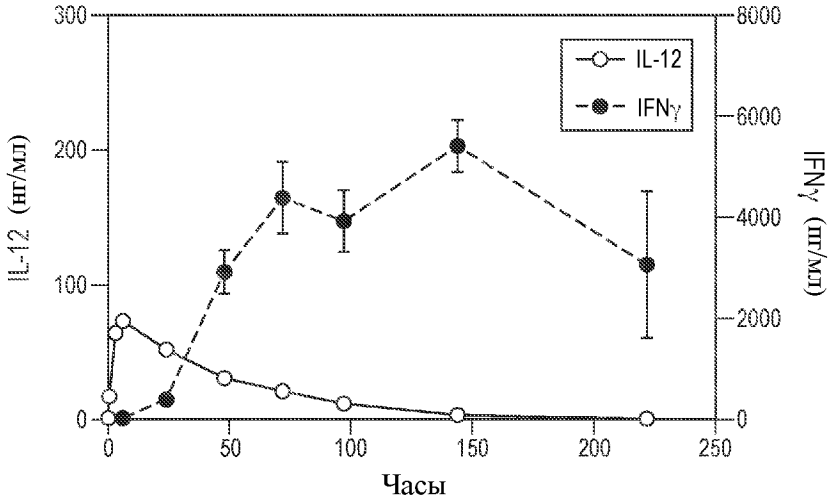
ФИГ. 15A



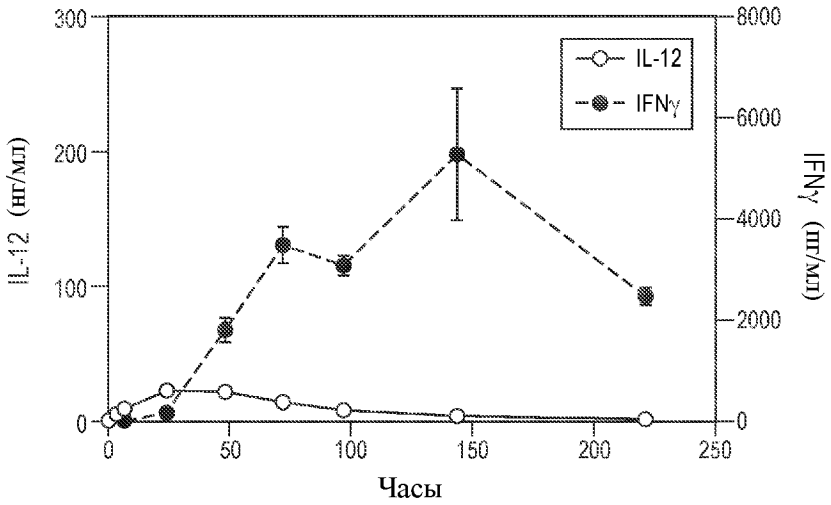
ФИГ. 15B



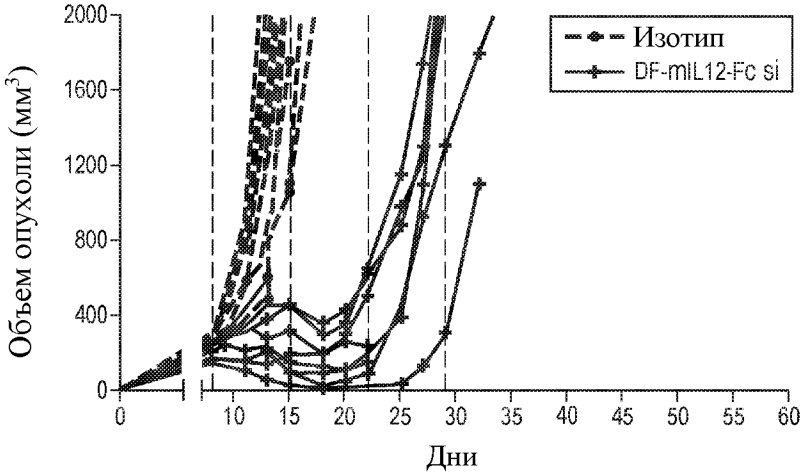
ФИГ. 15C



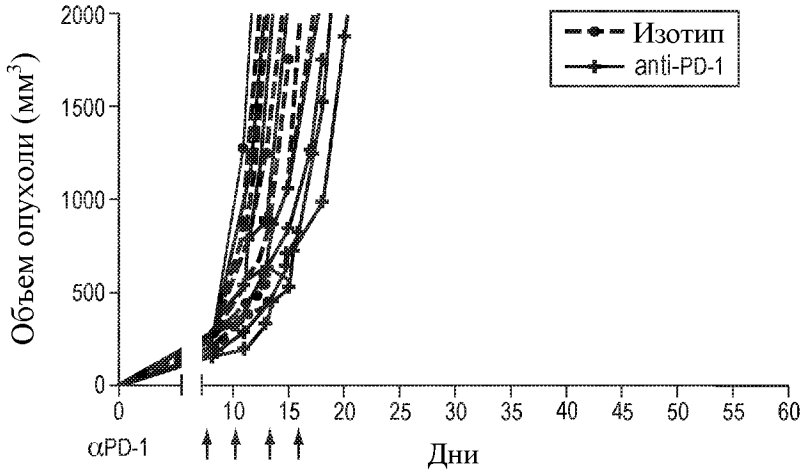
ФИГ. 15D


300
200
100
0
IL-12 (нг/мл)
8000
6000
4000
2000
0
IFNγ (пг/мл)
IL-12
IFNγ
0
50
100
150
200
250
Часы

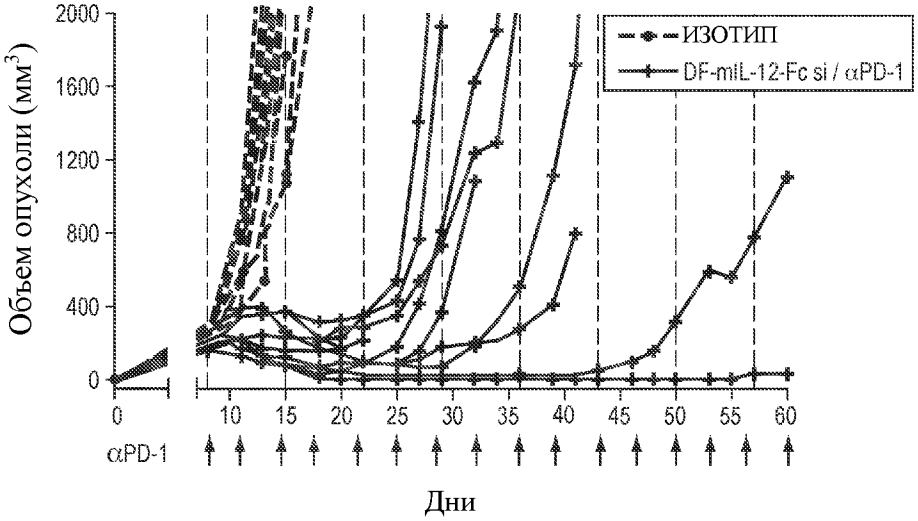
ФИГ. 15E



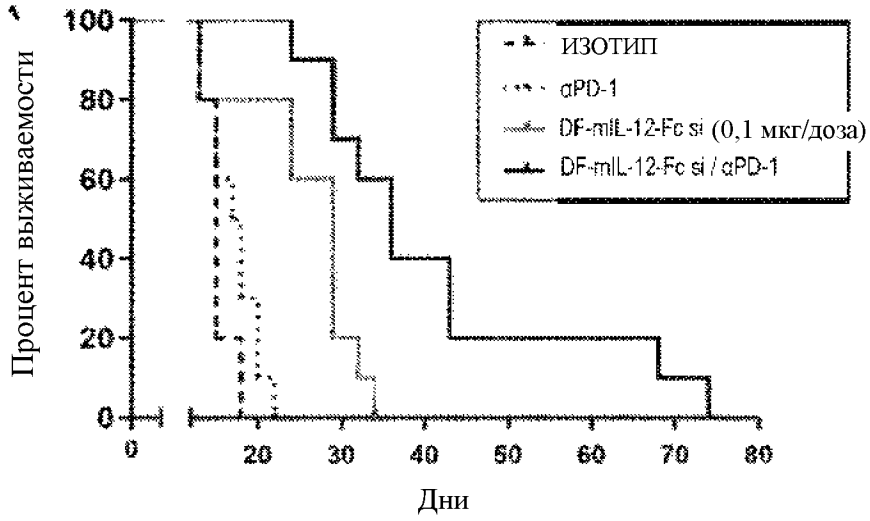
ФИГ. 16А



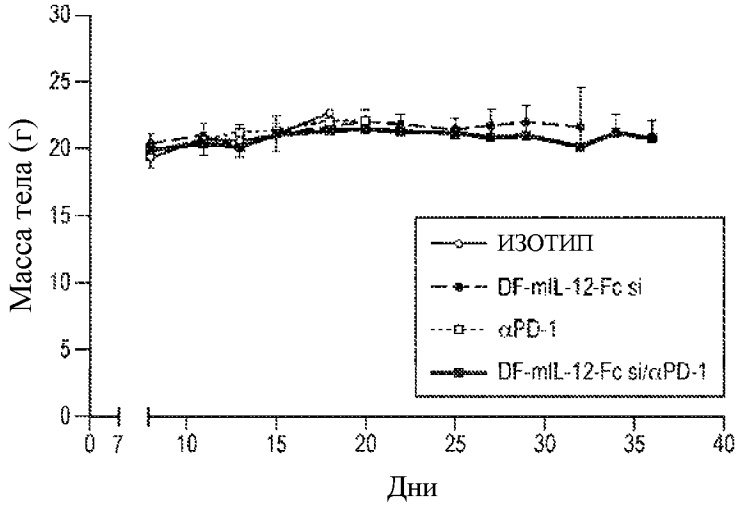
ФИГ. 16В


Объем опухоли (мм^3)
2000
1600
1200
800
400
0
0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
αPD-1
Дни
ИЗОТИП
DF-mIL-12-Fc si / αPD-1

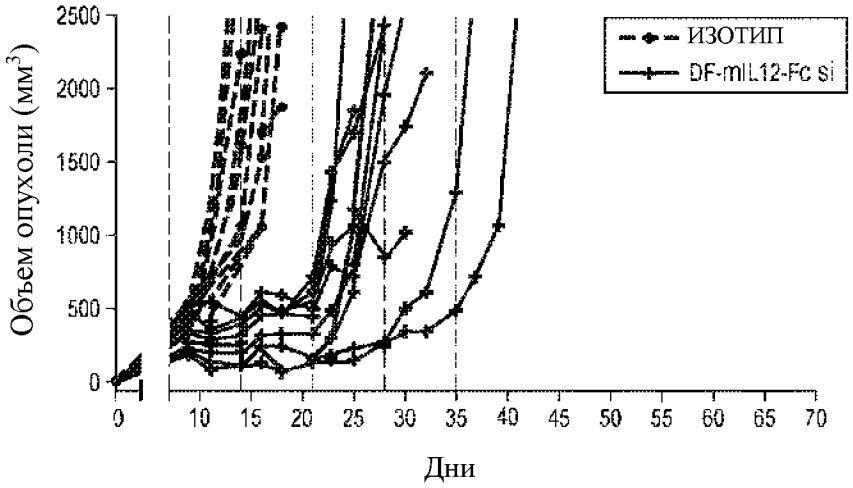
ФИГ. 16C



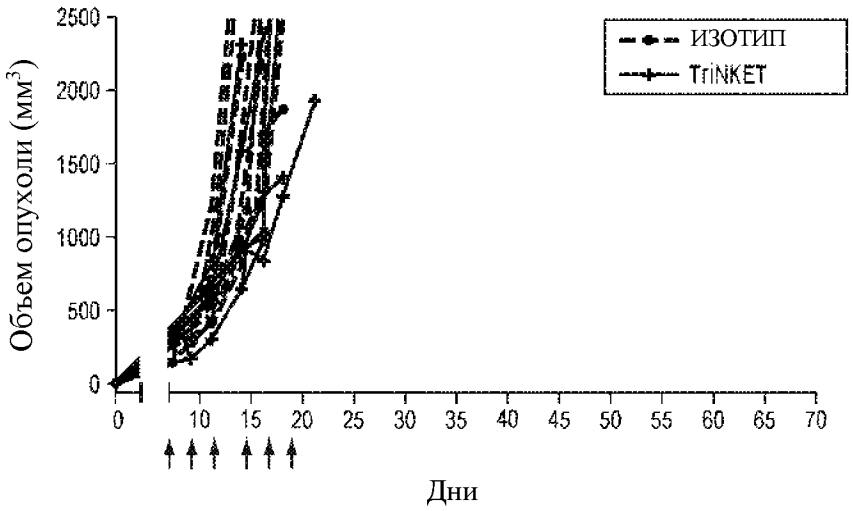
ФИГ. 17A



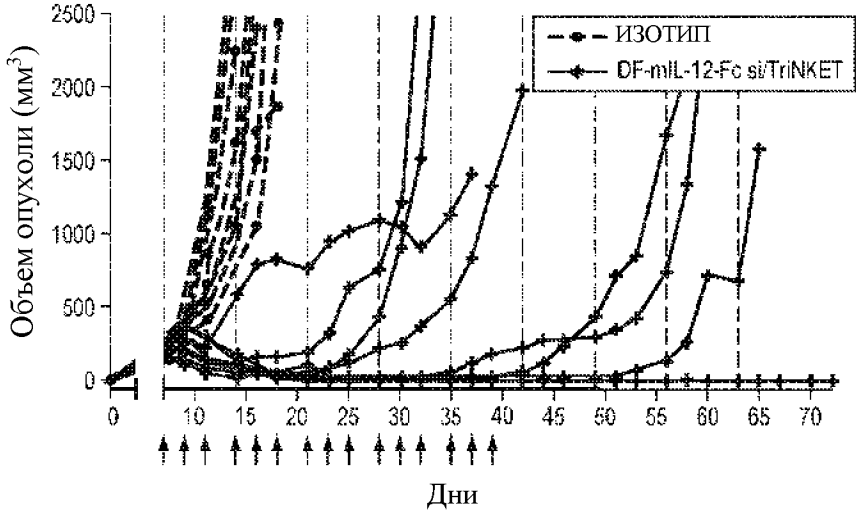
ФИГ. 17B



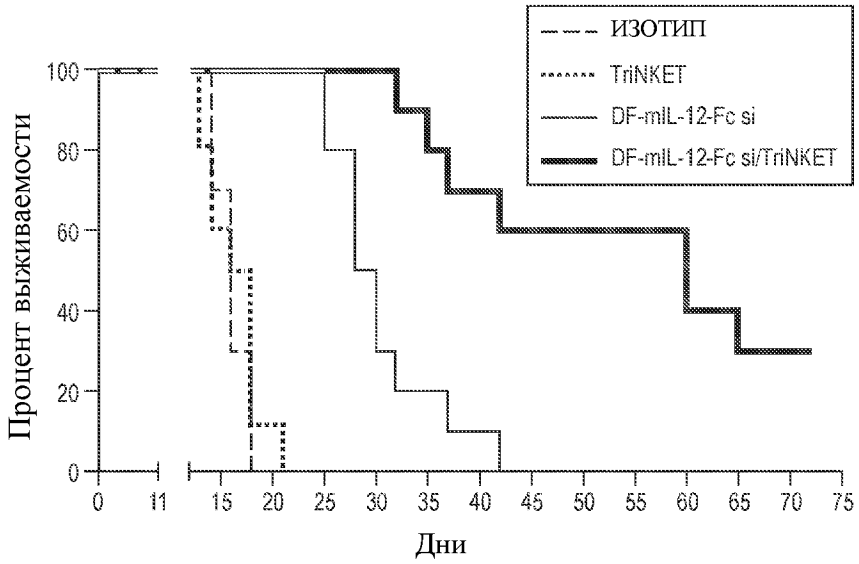
ФИГ. 18А



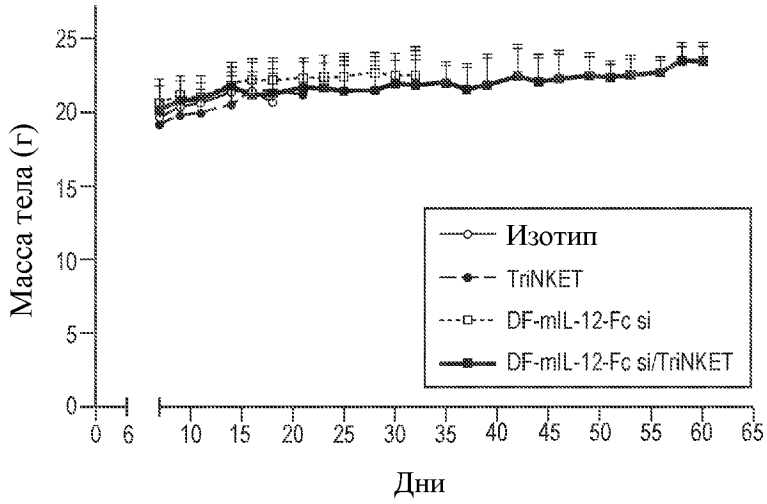
ФИГ. 18В


Объем опухоли (мм^3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
Дни
ИЗОТИП
DF-mIL-12-Fc si/TriNKET

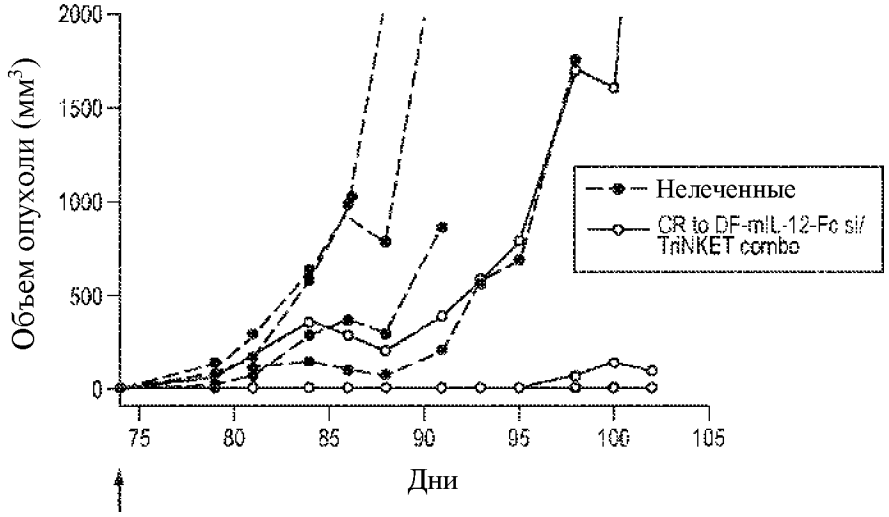
ФИГ. 18C



ФИГ. 19A

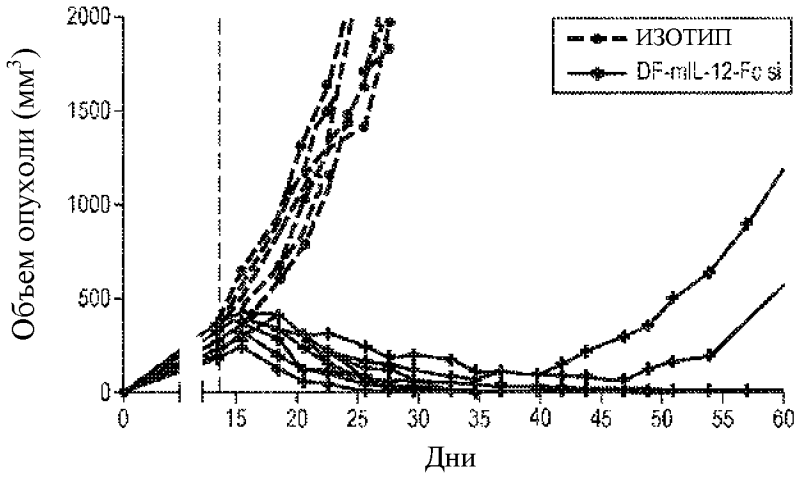


ФИГ. 19B

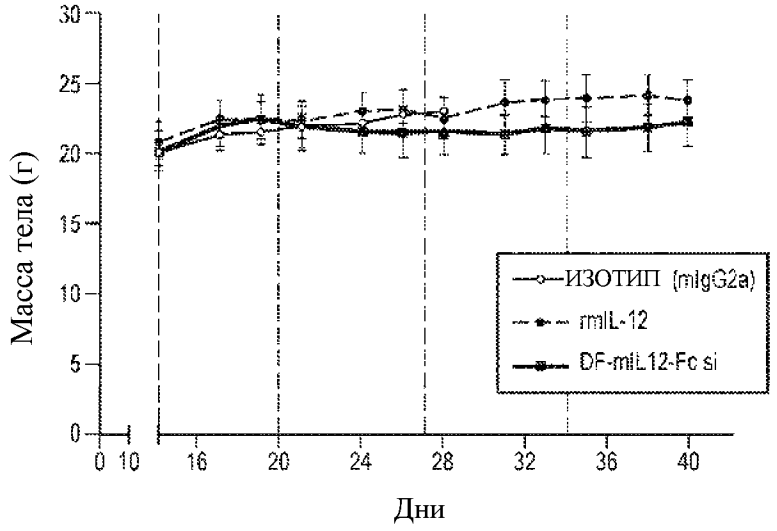


Повторная инокуляция опухолевых клеток

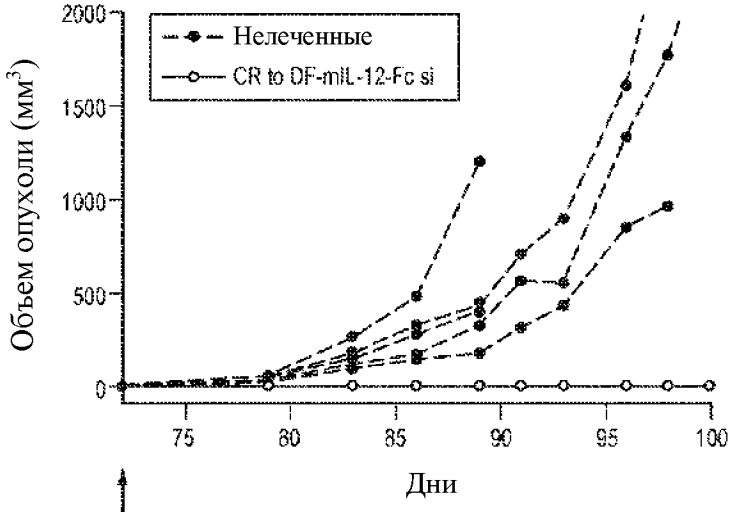
ФИГ. 20



ФИГ. 21А

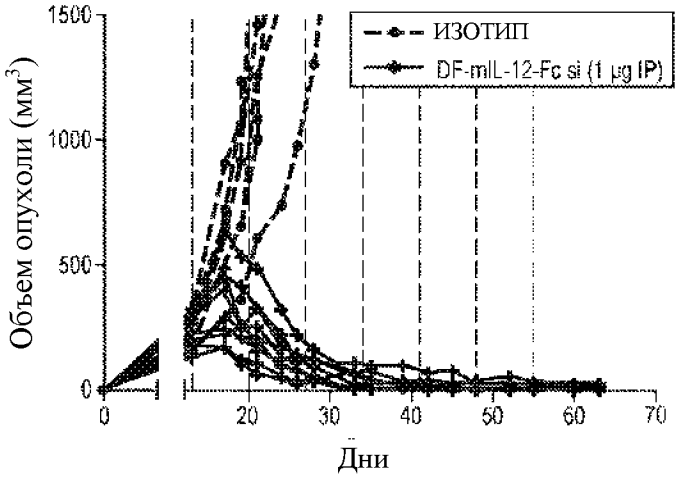


ФИГ. 21В

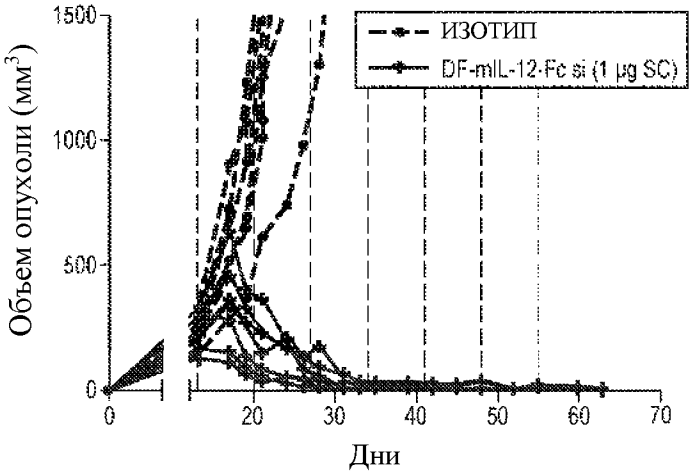


Повторная инокуляция опухолевых клеток

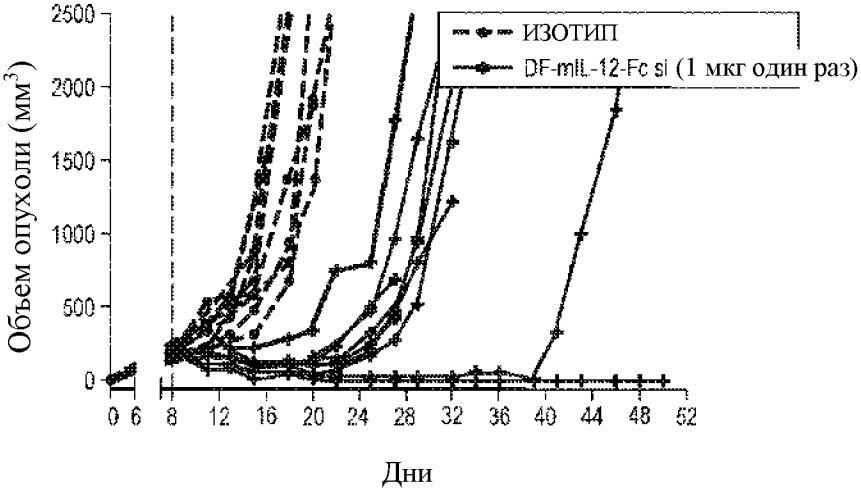
ФИГ. 21С



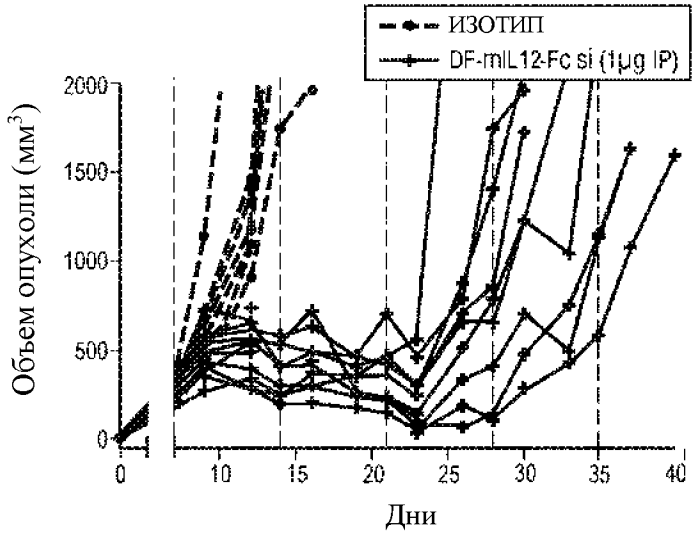
ФИГ. 22А



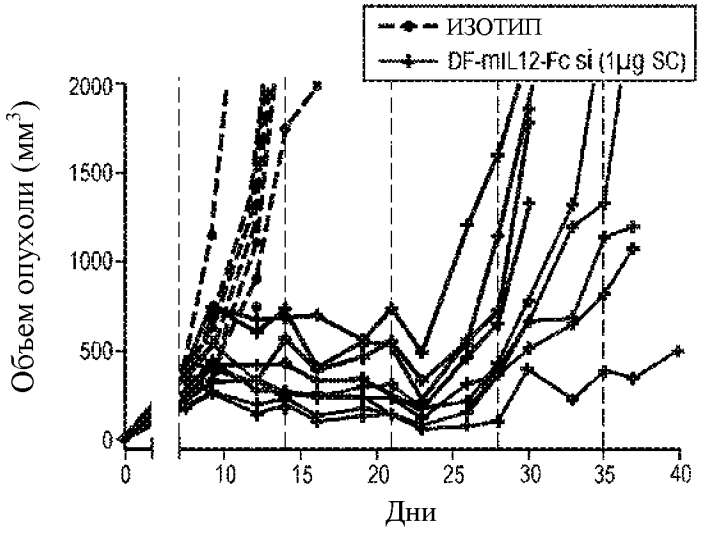
ФИГ. 22В


ИЗОТИП
DF-mIL-12-Fc si (1 мкг один раз)
Объем опухоли (мм^3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 6 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52
Дни

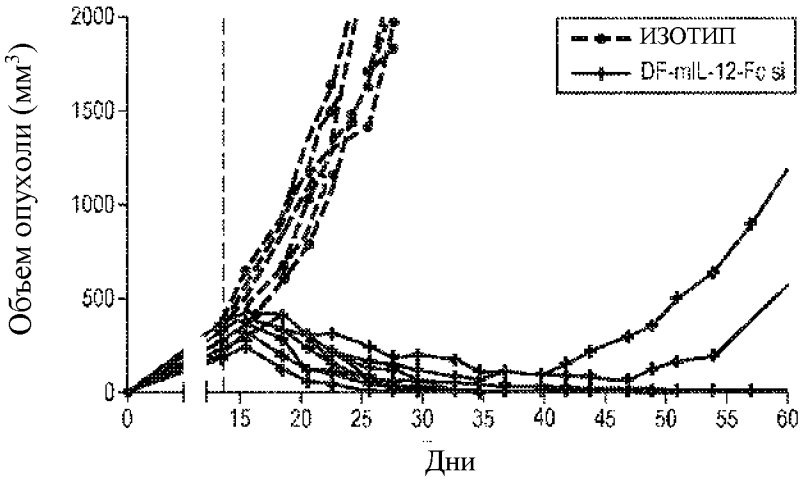
ФИГ. 23



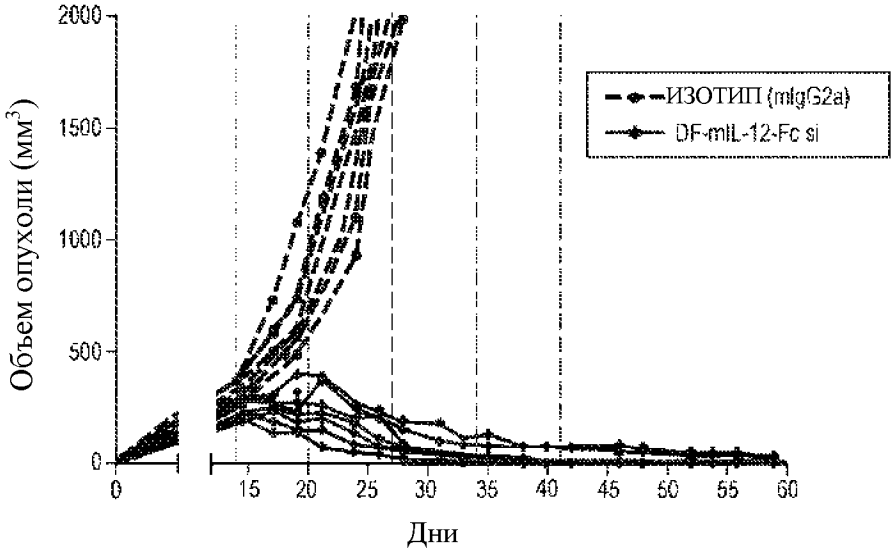
ФИГ. 24А



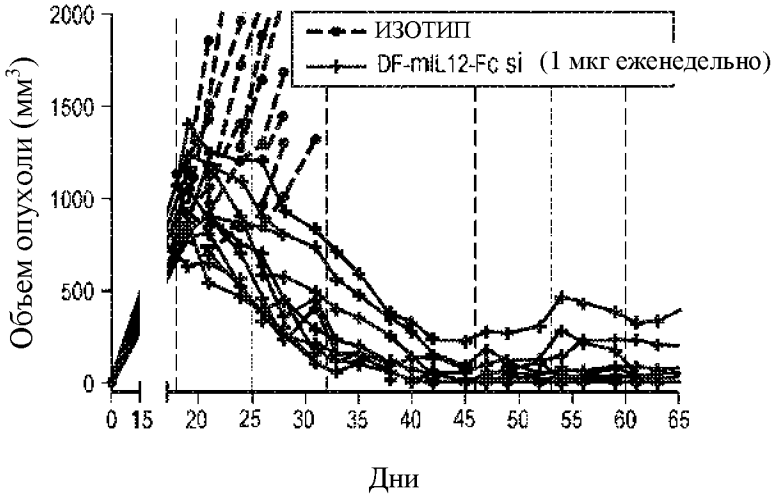
ФИГ. 24В



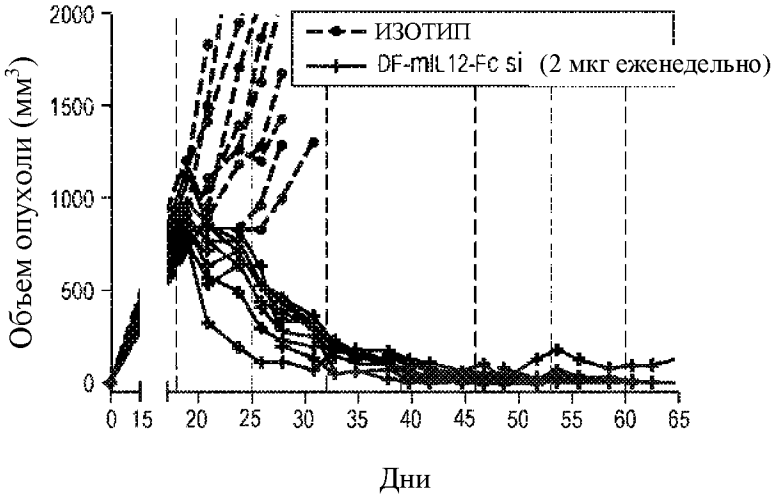
ФИГ. 25А



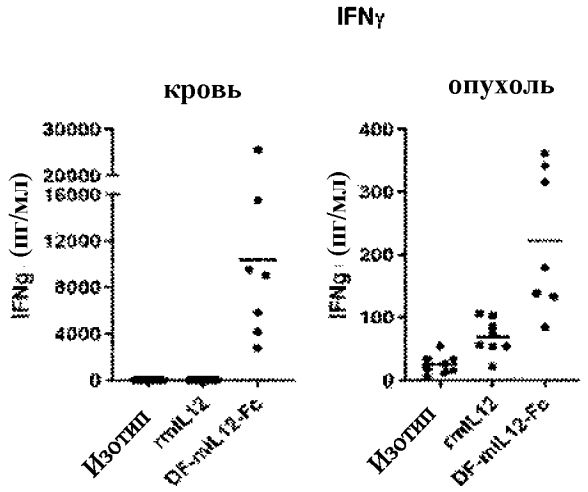
ФИГ. 25В



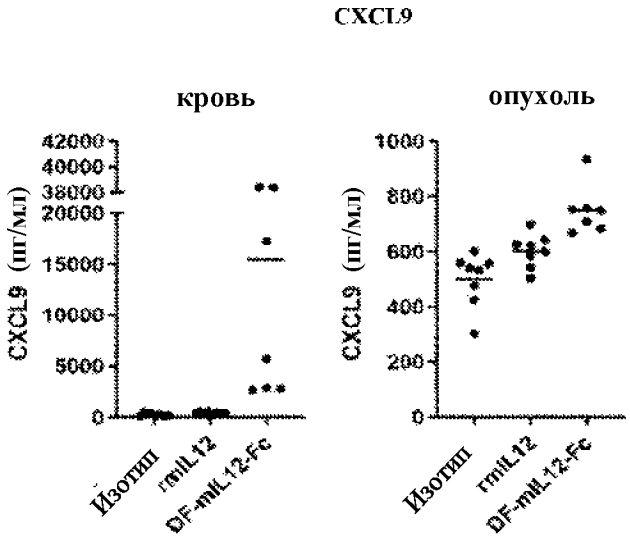
ФИГ. 26А



ФИГ. 26В

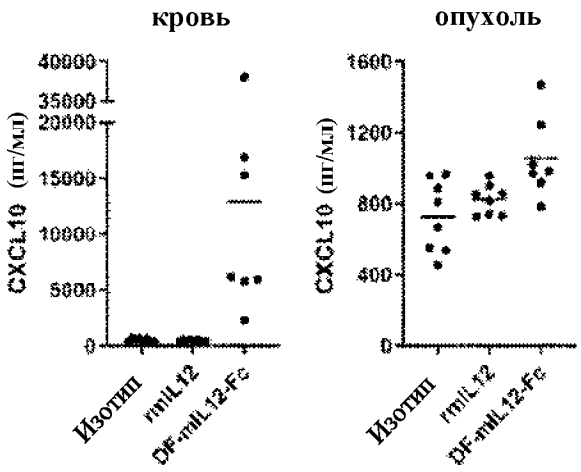


ФИГ. 27A

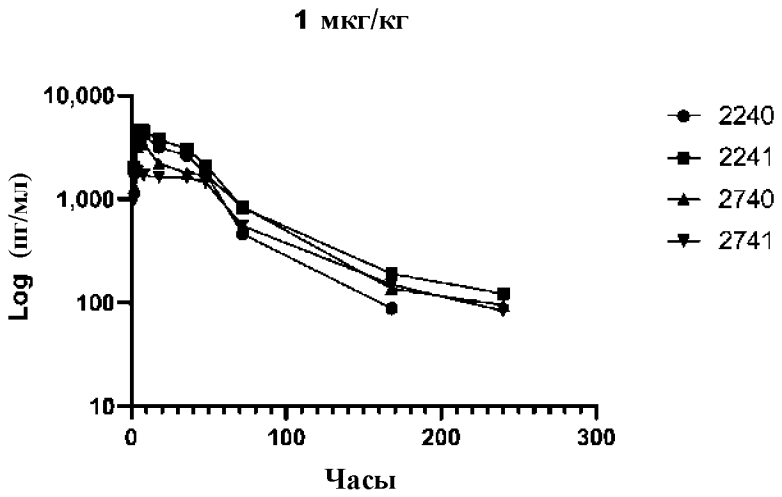


ФИГ. 27B

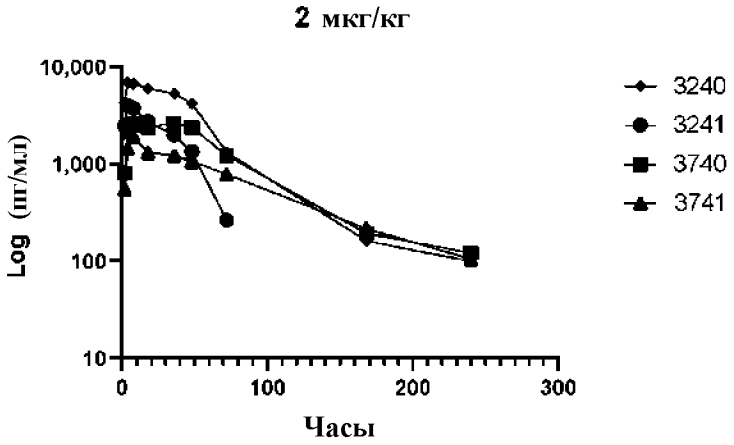
CXCL10



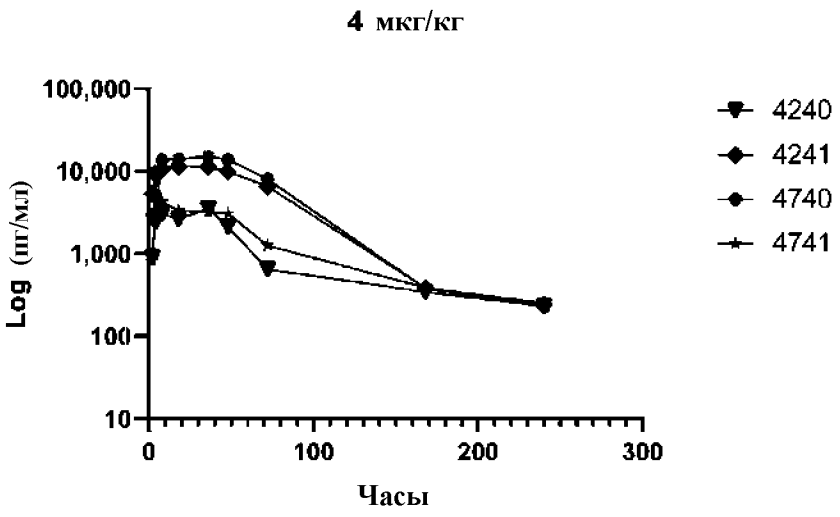
ФИГ. 27C



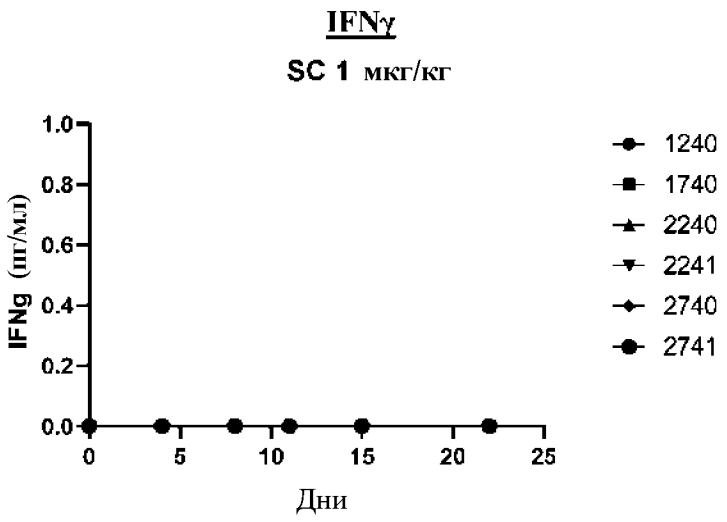
ФИГ. 28А



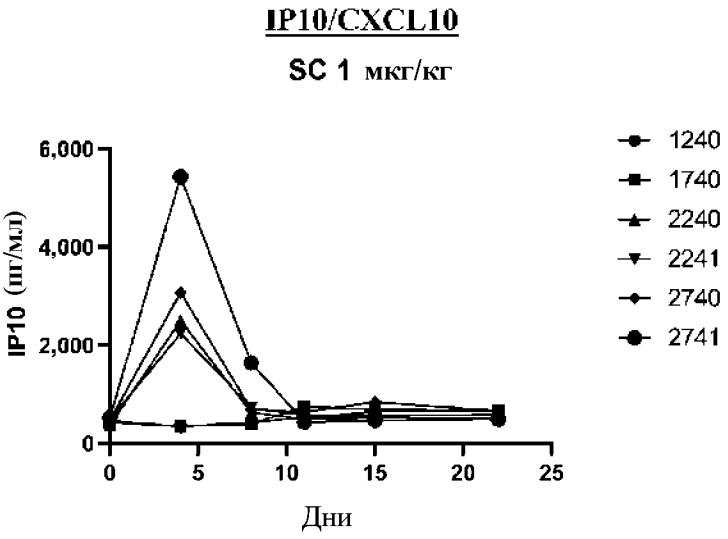
ФИГ. 28В


4 мкг/кг
100,000
10,000
1,000
100
10
Log (нг/мл)
0
100
200
300
Часы
4240
4241
4740
4741

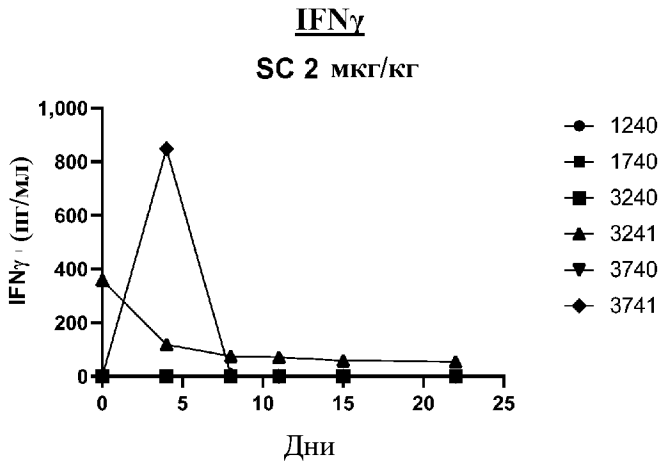
ФИГ. 28C



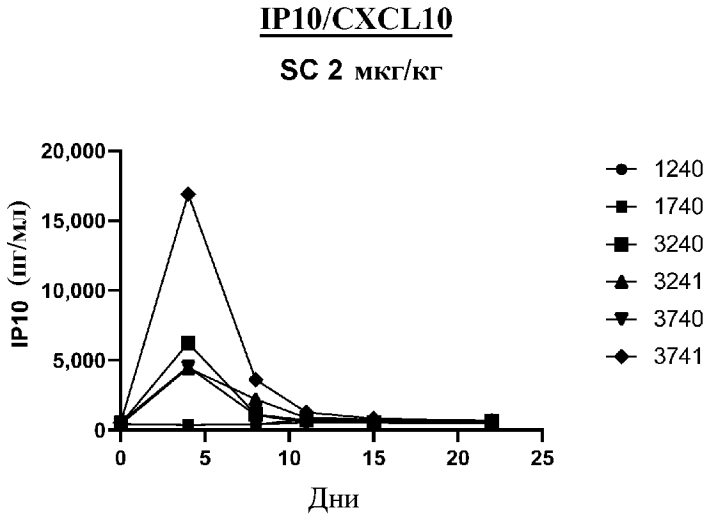
ФИГ. 29A



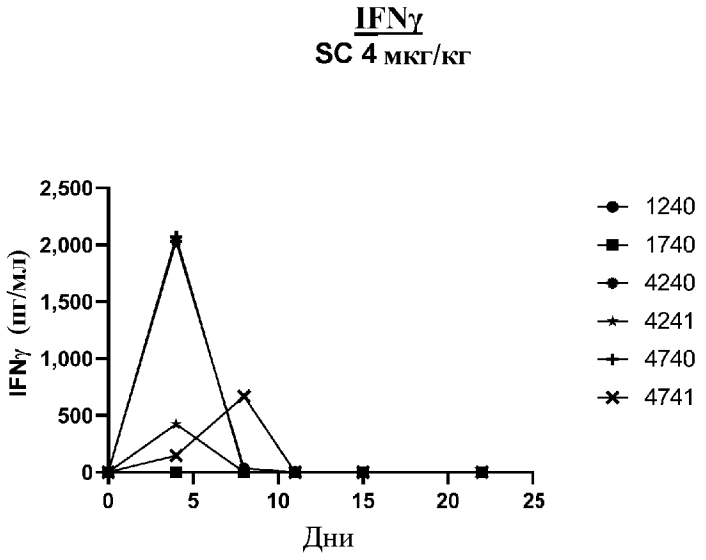
ФИГ. 29B



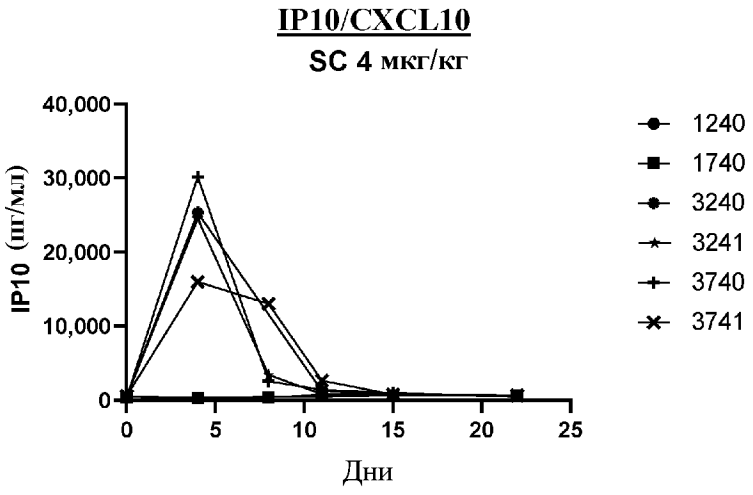
ФИГ. 29C



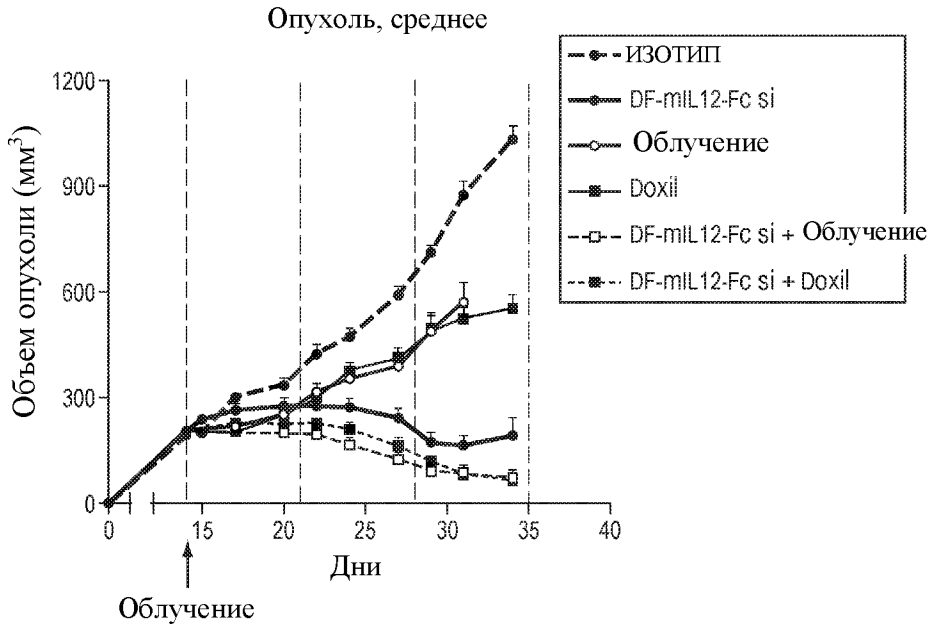
ФИГ. 29D



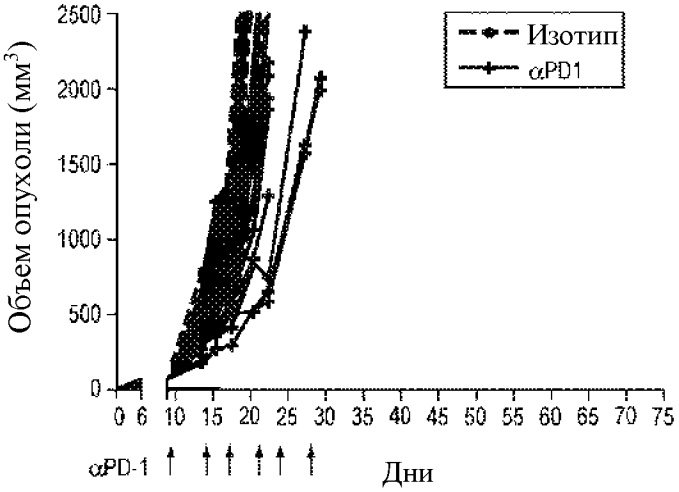
ФИГ. 29E



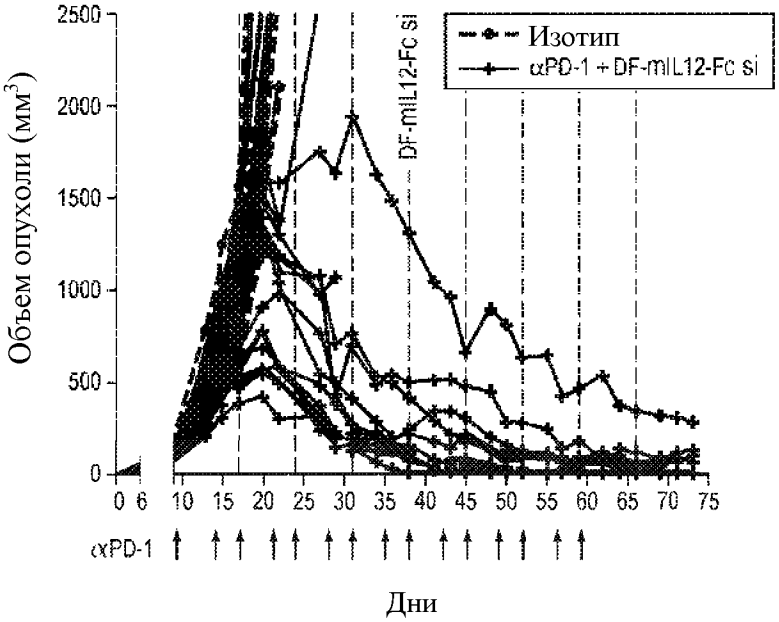
ФИГ. 29F


Опухоль, среднее
Объем опухоли (мм^3)
1200
900
600
300
0
0
15
20
25
30
35
40
Дни
Облучение
ИЗОТИП
DF-mIL12-Fc si
Облучение
Doxil
DF-mIL12-Fc si + Облучение
DF-mIL12-Fc si + Doxil

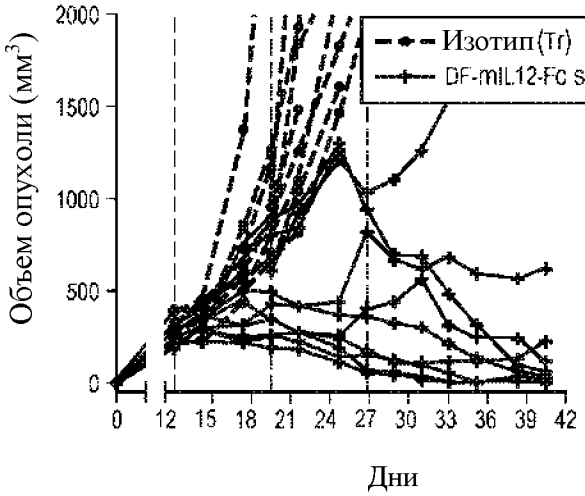
ФИГ. 30



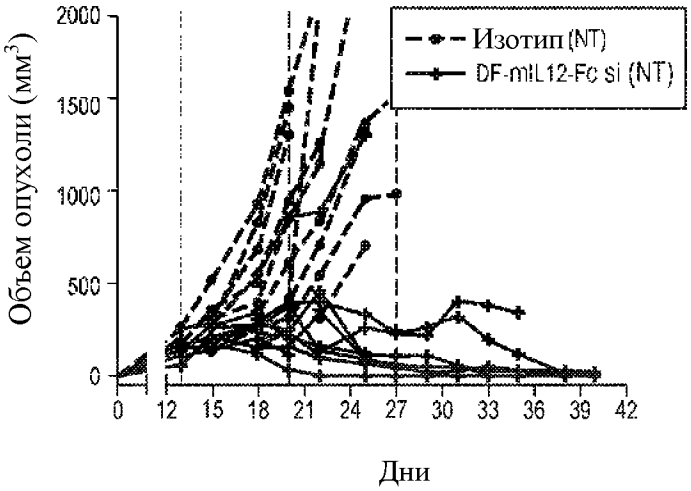
ФИГ. 31А



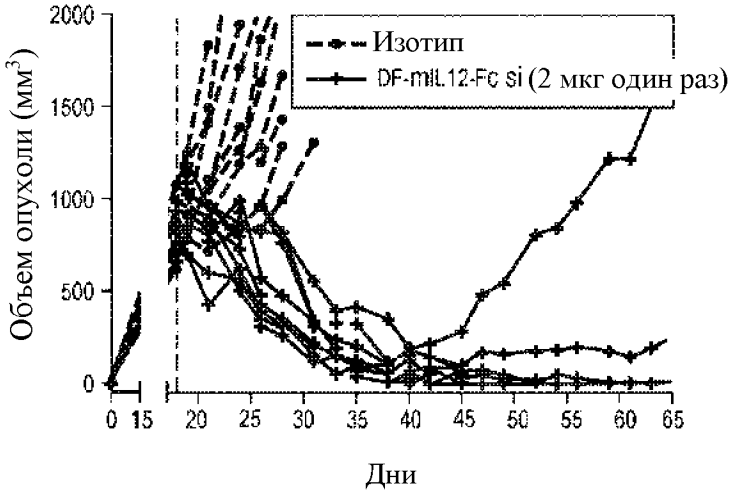
ФИГ. 31В



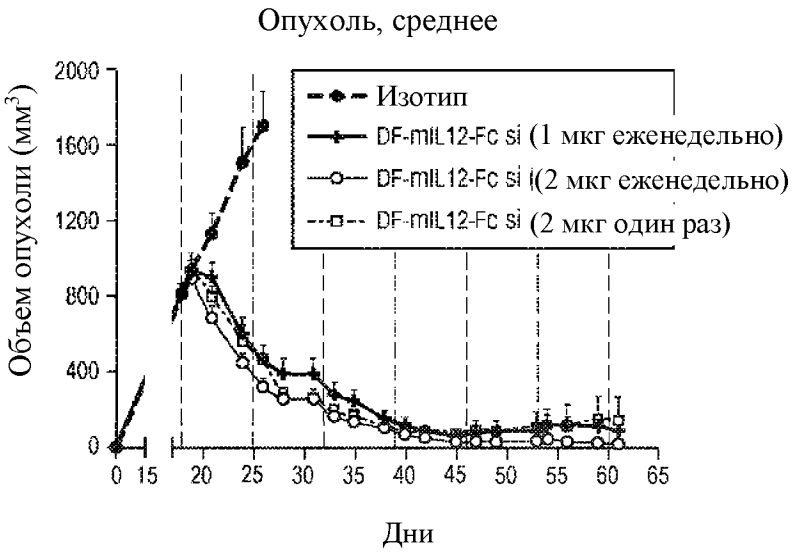
ФИГ. 32А



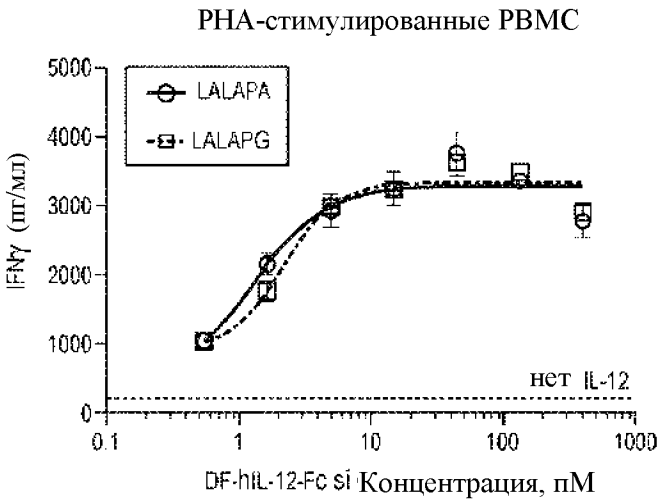
ФИГ. 32В



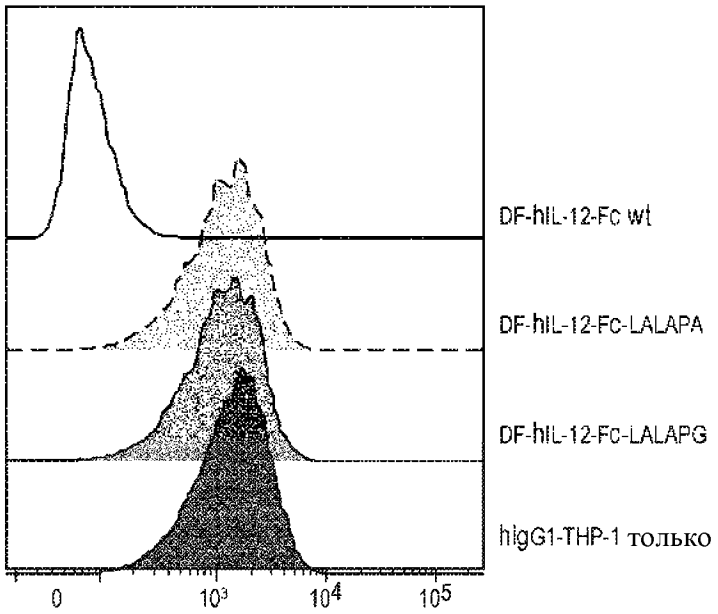
ФИГ. 33А



ФИГ. 33В



ФИГ. 34A



ФИГ. 34B