

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045313**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.15

(21) Номер заявки
202091342

(22) Дата подачи заявки
2015.08.05

(51) Int. Cl. **A61K 38/20** (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(54) **СЛИТЫЕ БЕЛКИ ИНТЕРЛЕЙКИН-2/РЕЦЕПТОР ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 АЛЬФА И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/033,726**

(32) **2014.08.06**

(33) **US**

(43) **2020.11.30**

(62) **201790063; 2015.08.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮНИВЕРСИТИ ОФ МАЙАМИ (US)

(72) Изобретатель:
Малек Томас (US)

(74) Представитель:
Угрюмов В.М., Гизатуллин Ш.Ф. (RU)

(56) **WO-A3-2011123683**
US-A1-20060263857
WO-A1-2014023752

Melder R.J. et al. Pharmacokinetics and in vitro and in vivo anti-tumor response of interleukin-2-human serum albumin fusion protein in an mice. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2005, V. 54, № 6, pp. 535-547, реферат

Puskas J. et al. Development of an attenuated interleukin-2 fusion protein that can be activated by tumour-expressed proteases. Immunology, 2011, V. 133, № 2, pp. 206-220, реферат, фиг. 1-2
RU-C2-2235729

(57) В изобретении предусмотрены различные способы и композиции, которые можно использовать для модулирования иммунной системы. Композиции включают в себя слитый белок, содержащий: (а) первый полипептид, содержащий интерлейкин-2 (IL-2) или его функциональный вариант или фрагмент; и (b) второй полипептид, слитый в пределах рамки считывания с первым полипептидом, причем второй полипептид содержит внеклеточный домен рецептора интерлейкина-2 альфа (IL-2Rα) или его функциональный вариант или фрагмент, и при этом слитый белок характеризуется активностью IL-2. Предусмотрены различные способы модулирования иммунного ответа у субъекта, предусматривающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества раскрытого в изобретении слитого белка IL-2/IL-2Rα.

B1**045313****045313****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Раскрытый в настоящем документе объект изобретения в общем относится к способам и композициям для модулирования иммунного ответа с использованием слитого белка интерлейкин-2/рецептор интерлейкина-2 альфа.

Ссылка на перечень последовательностей, поданный в виде текстового файла через EFS-Web

Официальная копия перечня последовательностей подана одновременно с описанием изобретения в виде текстового файла посредством EFS-Web, в соответствии с Американским стандартным кодом обмена информацией (ASCII) с именем файла 464173seqlist.txt, датой создания 30 июля 2015 г. и размером, составляющим 139 KB. Перечень последовательностей, поданный посредством EFS-Web, является частью настоящего описания изобретения, и тем самым полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Заявление о финансируемом из федерального бюджета исследовании или разработке

Настоящее изобретение было осуществлено при государственной поддержке согласно гранту № RO I DK093866, присужденному Национальному институту здоровья (National Institute of Health, NIH), Национальному институту диабета, болезней пищеварительной системы и почек (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIDDK). Государство имеет определенные права на настоящее изобретение.

Предшествующий уровень техники изобретения

Интерлейкин-2 (IL-2) представляет собой биологическое средство, которое использовали в попытках стимулировать иммунные ответы у пациентов со злокачественными опухолями и ВИЧ/СПИД. В последнее время пониженные дозы IL-2 использовали для селективной стимуляции толерантности для подавления нежелательных иммунных ответов, связанных с атакой собственных тканей, похожей на аутоиммунную. Важно, что эти пониженные дозы IL-2 не продемонстрировали никаких признаков усиления или повторной активации аутореактивных Т-клеток. Тем не менее, IL-2 характеризуется важными недостатками в качестве терапевтического средства, включая в себя очень короткий период полужизни *in vivo*, который ограничивает его эффективность, и токсичность в высоких дозах. По этим причинам для применения необходимы новые биологические средства на основе IL-2, характеризующиеся улучшенной фармакокинетикой и продолжительностью ответов.

Краткое раскрытие изобретения

Предусмотрены различные способы и композиции, которые можно использовать для модулирования иммунной системы. Композиции включают в себя слитый белок, содержащий: (а) первый полипептид, содержащий интерлейкин-2 (IL-2) или его функциональный вариант или фрагмент; и (b) второй полипептид, слитый в пределах рамки считывания с первым полипептидом, причем второй полипептид содержит внеклеточный домен рецептора интерлейкина-2 альфа (IL-2R α) или его функциональный вариант или фрагмент, и при этом слитый белок характеризуется активностью IL-2.

Предусмотрены различные способы уменьшения иммунного ответа у субъекта, предусматривающие введение субъекту, нуждающемуся в уменьшении иммунного ответа, терапевтически эффективного количества слитого белка IL-2/IL-2R α , раскрытого в настоящем документе.

Дополнительно предусмотрены способы увеличения иммунного ответа у субъекта, предусматривающие введение субъекту, нуждающемуся в увеличении иммунного ответа, терапевтически эффективного количества слитого белка IL-2/IL-2R α , раскрытого в настоящем документе. Дополнительно предусмотрены способы увеличения активности Т-регуляторных клеток.

Предусмотрены дополнительные способы, включая в себя усиление иммуногенности вакцины или преодоление подавленного иммунного ответа на вакцину у субъекта, предусматривающие следующее: (а) введение субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка IL-2/IL-2R α , раскрытого в настоящем документе; и (b) введение субъекту вакцины, причем слитый белок усиливает иммуногенность вакцины или преодолевает подавленный иммунный ответ на вакцину.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена схема слитого белка IL-2/IL-2R α , где L=лидерный пептид, LK=линкерная область, G=глицин, H=гистидин и T=терминирующий кодон.

На фиг. 2A и 2B представлены предсказанные белковые последовательности неограничивающих примеров слитых белков IL-2/IL-2R α . На фиг. 2A представлены предсказанные белковые последовательности неограничивающих примеров мышинных слитых белков IL-2/IL-2R α . Последовательности мышинного IL-2 и IL-2R α показаны выше и ниже слитых белков, соответственно. Последовательность, обозначенная как IL-2 представлена в SEQ ID NO: 3; последовательность, обозначенная как IL-2-(G4S)4-IL-2R α , представлена в SEQ ID NO: 54; последовательность, обозначенная как IL-2-(G4S)5-IL-2R α , представлена в SEQ ID NO: 55; последовательность, обозначенная как IL-2-(G3S)4-IL-2R α , представлена в SEQ ID NO: 56; последовательность, обозначенная как IL-2-(G3S)3-IL-2R α , представлена в SEQ ID NO: 57; и внеклеточный домен IL-2R α представлен в SEQ ID NO: 10. На фиг. 2B представлены предсказанные белковые последовательности неограничивающих примеров слитых белков IL-2/IL-2R α человека. Последовательности IL-2 и IL-2R α человека показаны выше и ниже слитых белков, соответственно. По-

последовательность, обозначенная как IL-2, представлена в SEQ ID NO: 1; последовательность, обозначенная как IL-2-(G₃S)₂-IL-2R α , представлена в SEQ ID NO: 58; последовательность, обозначенная как IL-2-(G₃S)₃-IL-2R α , представлена в SEQ ID NO: 59; последовательность, обозначенная как IL-2-(G₃S)₄-IL-2R α , представлена в SEQ ID NO: 60; последовательность, обозначенная как IL-2-(G₄S)₄-IL-2R α , представлена в SEQ ID NO: 61; и внеклеточный домен IL-2R α представлен в SEQ ID NO: 7.

На фиг. 3 показана биоактивность слитых белков IL-2/IL-2R α . Клетки COS-7 трансфектировали с помощью кДНК слияния IL-2/IL-2R α с указанными линкерами. Супернатанты их указанных клеток культивировали с активированными Т-лимфобластами к CD3 для оценки активности IL-2. (А) Пролиферативные ответы Т-лимфобластов после разведений указанных слитых белков. (В) Эффект антитела к IL-2 на пролиферацию, стимулированную 1:2 разведением супернатанта культуры, содержащего указанные слитые белки.

На фиг. 4 показана активность очищенных слитых белков IL-2/IL-2R α . Супернатанты трансфектированных клеток CHO использовали для очистки IL-2/(G₃S)₃/IL-2R α и IL-2/(Gly₄Ser)₄/IL-2R α с помощью аффинной хроматографии с использованием никеля в отношении метки 6х-His. (А) Измерение биоактивности IL-2 с помощью пролиферации анти-CD3 Т-лимфобласта к указанному очищенному слитому белку. (В) Эффект каждого очищенного слитого белка на ингибирование связывания моноклональных антител к IL-2R α PC61 и 7D4, направленных на нелигандный сайт связывания, с активированными Т-лимфобластами к CD3.

На фиг. 5 показано, что моноклональное антитело к IL-2R α , которое направлено на сайт связывания IL-2 IL-2R α , не может связываться со слитым белком IL-2/IL-2R α . Очищенные слитые белки с вариативными линкерами, как указано, вначале инкубировали с моноклональным антителом к IL-2R α 3C7, направленным на сайт связывания лиганда IL-2R α , или моноклональным антителом 7D4, направленным на нелигандный сайт связывания IL-2R α . Способность 3C7 или 7D4 в дальнейшем связываться с IL-2R α клеточной поверхности оценивали с использованием IL-2R α -трансфектированных клеток EL4.

На фиг. 6 показаны биохимические свойства очищенного IL-2/IL-2R α . (А) Очищенный IL-2/IL-2R α подвергали анализу SDS-PAGE при восстанавливающих и невосстанавливающих условиях; IL-2/IL-2R α визуализировали с помощью анализ вестерн-блоттинга с использованием в качестве зонда антитело, направленное на метку 6х-His слитого белка. (В) Указанное количество очищенного IL-2/(Gly₁Ser)₃/IL-2R α подвергали анализу SDS-PAGE при восстанавливающих условиях с последующим окрашиванием кумаси синим.

На фиг. 7 показан эффект слитого белка IL-2/IL-2R α на IL-2-зависимую передачу сигнала *in vivo*. Мыши C57BL/6 получали однократную инъекцию *i.p.* (интраперитонеально) IL-2/(G₃S)₃/IL-2R α (4000 единиц активности IL-2), и содержания pSTAT5 в указанных популяциях спленоцитов немедленно оценивали. Содержания pSTAT5 определяли через 0,5 ч после инъекции слитого белка IL-2/IL-2R α . Для CD4⁺ Т-клеток клетки гейтировали по исключенным Foxp3⁺ Treg клеткам.

На фиг. 8 показан эффект слитого белка IL-2/IL-2R α на Treg клетки *in vivo*. Мышам NOD 3 раза вводили *i.p.* инъекцию (1, 3, 5 день) указанного количества активности IL-2, ассоциированной с IL-2/(G₃S)₃/IL-2R α . Эффект на Treg оценивали в отношении селезенки, лимфатических узлов поджелудочной железы (PLN) и поджелудочной железы через 24 ч после последней инъекции. Оценивали соотношение Treg в CD4⁺ Т-клеток; среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) в отношении экспрессии CD25 клетками Treg после нормирования к экспрессии CD25 клетками Treg от получивших лечение с помощью контроля мышей; пролиферативный статус Treg, оцениваемый по экспрессии пролиферативного маркера Ki67; и % Treg, которые экспрессировали Klr β 1, который является маркером IL-2-зависимой терминально-дифференцированной субпопуляции.

На фиг. 9 показано сравнение слитого белка IL-2/IL-2R α и рекомбинантного IL-2 в отношении индукции изменений в Treg клетках *in vivo*. Мыши C57BL/6 получали 3 раза (1, 3, 5 день) *i.p.* инъекцию IL-2/(G₃S)₃/IL-2R α (2000 единиц), рекомбинантного IL-2 человека (25000 единиц) или предварительно образованных комплексов антитела к IL-2 (Jes-6.1; 5 мкг) и мышинового IL-2 (10000 единиц) (IL2/IC). Эффект на Treg оценивали в отношении селезенки через 24, 72 ч и 1 неделю после последней инъекции. Treg оценивали, как описано на фиг. 8.

На фиг. 10 показало, что ограниченное применение низкодозового IL-2 замедляет сахарный диабет у мышей NOD. Мыши NOD (8 мышей/группа) получали IL-2/IL-2R α , растворимый IL-2R α или PBS согласно схеме в (А). Содержания глюкозы в моче и крови подвергали мониторингу, пока мыши не достигали возраста 40 недель. Мышей считали диабетическими после 2 последовательных определений содержания глюкозы, составляющих >250 мг/дл.

На фиг. 11 продемонстрировано, что высокодозовый IL-2/IL-2R α усиливает развитие CD8⁺ Т-клеточной памяти. Мыши C57BL/6 получали конгенные специфические к рестриктированному I классом овалбумину (OVA) трансгенные в отношении OT-I Т-клеточного рецептора Т-клетки. Указанных мышей иммунизировали и лечили с помощью однократного нанесения слитого белка IL-2/(G₃S)₃/IL-2R α , IL2/IC содержащего 15000 единиц IL-2, или рекомбинантного IL-2 (25000 единиц). В указанные временные

точки оценивали относительную долю Т-клеток OT-1 в пределах общего CD8⁺ Т-клеточного компартамента в периферической крови.

На фиг. 12 показан тип персистирующих клеток памяти OT-I, поддерживаемый высокодозовым слитым белком IL-2/IL-2R α : (А) Стратегия гейтирования для идентификации клеток эффекторной памяти (ЕМ) и центральной памяти (СМ). (В) Распределение клеток памяти OT-1 на 28 и 202 день после иммунизации мышей, которые также получали IL-2/IL-2R α (12000 единиц).

На фиг. 13 показано определение характеристик слитых белков IL-2/IL-2R α человека, содержащих глицин/сериновые линкеры изменяющейся длины, как это показано. (А) IL-2-биоактивность очищенного IL-2/IL-2R α человека с использованием биоанализа CTLL. (В) Анализ вестерн-блоттинг слитых белков IL-2/IL-2R α человека после SDS-PAGE при восстанавливающих условиях.

На фиг. 14 показано, что человека слитый белок IL-2/IL-2R α связывает моноклональные антитела к IL-2R α . Очищенные слитые белки с указанными линкерами вначале инкубировали с моноклональным антителом к IL-2R α , BC96, направленным к лигандной области связывания IL-2R α человека, или моноклональным антителом M-A257, направленным к нелигандной области связывания IL-2R α человека. Способность BC96 или M-A257 в дальнейшем связываться с IL-2R α клеточной поверхности оценивали с использованием IL-2R α -трансфектированных клеток CHO.

На фиг. 15 показано, что IL-2 взаимодействует с сайтом связывания IL-2 IL-2R α в пределах слитых белков IL-2/IL-2R α человека. IL-2-биоактивность указанных слитых белков с переменными глицин/сериновыми линкерами оценивали с использованием клеток CTLL. Mut относится к слитым белкам, в которых IL-2R α содержал Arg³⁵→Thr, Arg³⁶→Ser мутации. Анализ вестерн-блоттинг подтвердил сходные количества всех слитых белков (не показано).

Подробное раскрытие изобретения

Настоящее изобретение далее будет более полно описано в настоящем документе со ссылкой на сопроводительные графические материалы, в которых показаны некоторые, но не все варианты осуществления настоящего изобретения. В действительности, настоящие изобретения можно осуществить во многих различных формах, и их не стоит рассматривать как ограниченные вариантами осуществления, представленными в настоящем документе; напротив, указанные варианты осуществления предусмотрены с тем, чтобы настоящее раскрытие удовлетворяло требованиям законодательства. Одинаковые числа относятся к одинаковым элементам во всем настоящем описании.

Многие характеризующиеся преимуществом идей, представленных в вышеизложенных описаниях и сопроводительных графических материалах, модификации и другие варианты осуществления настоящих изобретений, представленных в настоящем документе, станут очевидными специалисту в настоящей области техники, к которой относятся настоящие изобретения. Следовательно, следует понимать, что настоящие изобретения не следует ограничивать конкретными раскрытыми вариантами осуществления и что, как предусмотрено, модификации и другие варианты осуществления следует включать в объем прилагаемой формулы изобретения. Несмотря на то, что в настоящем документе используют специфические термины, их применяют исключительно в родовом и описательном смысле, а не с целью ограничения.

I. Обзор.

Современные технологии основаны на применении рекомбинантного интерлейкина-2 (IL-2), который характеризуется слабыми фармакологическими свойствами, особенно коротким периодом полужизни, что ограничивает его применимость. Предусмотренные в настоящем документе слитые белки интерлейкин-2/рецептор интерлейкина-2 альфа (IL-2/IL-2R α) характеризуются присущими им свойствами, которые отличают их от рекомбинантного IL-2 и других слитых белков IL-2. Во-первых, размер слитого белка IL-2/IL-2R α будет увеличивать его период полужизни *in vivo*. Во-вторых, слабое взаимодействие между IL-2 и IL-2R α (одна субъединица IL-2R) в пределах слитого белка IL-2/IL-2R α обеспечивает другой механизм для пролонгирования доступности IL-2. Не ограничиваясь конкретным механизмом действия, пролонгированная доступность активности IL-2 может быть обеспечена посредством конкурентного взаимодействия между фрагментом IL-2 с IL-2R α слияния IL-2/IL-2R α и с клетками, которые экспрессируют IL-2R.

II. Слитые белки интерлейкин-2/рецептор интерлейкина-2 альфа и кодирующие их полинуклеотиды.

Предусмотрен слитый белок, который содержит первый полипептид, содержащий интерлейкин-2 (IL-2) или его функциональный вариант или фрагмент, слитый в пределах рамки считывания со вторым полипептидом, содержащим или состоящим из внеклеточного домена полипептида рецептора интерлейкина-2 альфа (IL-2R α) или его функционального варианта или фрагмента.

Используемый в настоящем документе термин "слитый белок" относится к генетической связи в пределах рамки считывания по меньшей мере двух гетерологичных полипептидов. При транскрипции/трансляции образуется один белок. Таким образом, множественные белки или их фрагменты можно встроить в один полипептид. Предусмотрено, что "функционально связанный" означает функциональную связь между двумя или больше элементами. Например, функциональная связь между двумя поли-

пептидами обеспечивает слияние обоих полипептидов вместе в пределах рамки считывания с получением отдельного полипептидного слитого белка. Согласно конкретному аспекту слитый белок дополнительно содержит третий полипептид, который, как обсуждается дополнительно подробно ниже, может содержать линкерную последовательность.

Слитый белок IL-2/IL-2R α или его активный вариант или фрагмент может характеризоваться одним или несколькими следующими свойствами/активностями: (1) увеличение активности регуляторных Т-клеток (Treg) и/или увеличение иммунной толерантности в видах терапии на основе низкой дозы IL-2; (2) увеличение иммунного ответа и памяти в высокодозовых видах терапии; (3) увеличение доступности IL-2 по сравнению с рекомбинантным IL-2; и/или (4) увеличение стойкой стимуляции IL-2 несущих IL-2R лимфоцитов *in vivo*. Такая активность и способы анализа раскрыты более подробно в других местах в настоящем документе; см., например, пример 1, предусмотренный в настоящем документе.

Согласно одному неограничивающему варианту осуществления увеличенную активность Treg, которая является результатом слитого белка IL-2/IL-2R α или его активного варианта или фрагмента, можно оценить с помощью разнообразных путей, включая в себя, например, следующее: (1) увеличенная репрезентация и количество Treg в CD4⁺ Т-клеточном компартменте; (2) положительная регуляция IL-2-зависимого CD25; (3) увеличенная пролиферация согласно оценке с помощью экспрессии пролиферативного маркера Ki67; и (4) увеличенная фракция IL-2-зависимого терминально-дифференцированного подкласса Klr γ 1⁺ Treg. Такие эффекты на Treg можно наблюдать, например, в селезенке и воспаленной поджелудочной железе.

Согласно одному неограничивающему варианту осуществления слитый белок IL-2/IL-2R α или его активный вариант или фрагмент увеличивает толерогенные и подавляющие иммунный ответ Treg и иммунитет посредством увеличения ответов эффекторных Т-клеток памяти, и согласно дополнительным вариантам осуществления он проявляет улучшенную фармакокинетику путем доставки таких ответов (1) при пониженных эффективных уровнях активности IL-2 по сравнению с нативным или рекомбинантным IL-2; (2) проявляет более стойкие биологические ответы, чем нативный или рекомбинантный IL-2; и/или (3) сохраняет иерархию, при которой Treg реагируют на более низкие уровни дозы, чем эффекторные Т-клетки памяти.

Согласно конкретным вариантам осуществления слитый белок характеризуется улучшенной активностью по сравнению с нативным или рекомбинантным IL-2. Например, эффект слитого белка IL-2/IL-2R α может увеличивать толерогенные Treg при уровне активности IL-2 приблизительно в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз ниже или более низком уровне активности IL-2 по сравнению с нативным или рекомбинантным IL-2. Согласно другим вариантам осуществления слитый белок IL-2/IL-2R α является более эффективным, чем нативный или рекомбинантный IL-2 в индукции стойкого усиления Treg и связанных свойств.

Различные фрагменты и варианты IL-2 и IL-2R α из разнообразных организмов можно использовать для создания слитых белков IL-2/внеклеточный домен IL-2R α , предусмотренных в настоящем документе. Такие компоненты обсуждают более подробно в других местах в настоящем документе. Примеры неограничивающих непротессированных слитых белков IL-2/внеклеточный домен IL-2R α представлены в SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 36, 38, 44, 46, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 и 61, при этом неограничивающие примеры зрелых форм слитых белков IL-2/внеклеточный домен IL-2R α представлены в SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 37, 39, 43, 45, 62 и 64. Неограничивающие примеры полинуклеотидов, кодирующих такие слитые белки, представлены в SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 42, 47, 48, 49, 63 и 65.

Термин "секреторная сигнальная последовательность" обозначает полинуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид ("секреторный полипептид"), который, как компонент большего полипептида, направляет этот больший полипептид через секреторный путь клетки, в которой он синтезируется. Этот больший полипептид обычно расщепляется с удалением секреторного пептида во время прохождения через этот секреторный путь. Больший полипептид, как правило, расщепляется с удалением секреторного пептида во время транспортировки по секреторному пути. Используемый в настоящем документе термин "зрелая" форма слитого белка или полипептида предусматривает процессированную форму полипептида, из которой секреторный пептид был удален. Используемый в настоящем документе "непротессированная" форма слитого белка сохраняет секреторную пептидную последовательность.

Кроме того, предусмотрены биологически активные фрагменты и варианты зрелой и непротессированной формы слитых белков IL-2/внеклеточный домен IL-2R α и кодирующий их полинуклеотид. Такой функциональный полипептидный фрагмент может содержать по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или больше непрерывных аминокислот согласно одной из SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 или 64. Альтернативно, функциональный полипептидный вариант может характеризоваться по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности относительно последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 или 64.

Дополнительно предусмотрены активные варианты и фрагменты полинуклеотидов, кодирующих слитые белки IL-2/внеклеточный домен IL-R α . Такой полинуклеотид может содержать по меньшей мере 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1100, 1200, 1300, 1500, 1800, 2000 непрерывных нуклеотидов SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 42, 47, 48, 49, 63 или 65, или полинуклеотид, кодирующий полипептиды, представленные в SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 или 64, и продолжать кодировать функциональный слитый белок IL-2/внеклеточный домен IL-R α . Альтернативно, функциональный полинуклеотид может характеризоваться по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности относительно последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 42, 47, 48, 49, 63 или 65, или полинуклеотид, кодирующий полипептиды, представленные в SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 или 64, и продолжать кодировать функциональные слитые белки IL-2/внеклеточный домен IL-R α .

Следует дополнительно отметить, что компоненты слитого белка IL-2/IL-2R α можно обнаружить в любом порядке. Согласно одному варианту осуществления полипептид IL-2 находится на N-конце, и внеклеточный домен IL-2R α находится на C-конце слитого белка.

i. Интерлейкин-2.

Используемый в настоящем документе "интерлейкин-2", или "IL-2" относится к любому нативному или рекомбинантному IL-2 от любого позвоночного, включая в себя млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), и одомашненные или сельскохозяйственные млекопитающие, если не указано иное. Термин предусматривает непроцессированный IL-2, а также любую форму IL-2, которая является результатом процессирования в клетке (т.е. зрелая форма IL-2). Термин также предусматривает встречающиеся в природе варианты и фрагменты IL-2, например, сплайс-варианты или аллельные варианты, и не встречающиеся в природе варианты. Аминокислотная последовательность иллюстративной зрелой формы IL-2 человека (характеризующейся сигнальной последовательностью из 20 аминокислот) показана в SEQ ID NO: 2. Непроцессированный IL-2 человека дополнительно содержит N-концевой сигнальный пептид из 20 аминокислот (SEQ ID NO: 1), который отсутствует в молекуле зрелого IL-2. Аминокислотная последовательность иллюстративной зрелой формы мышинного IL-2 (характеризующейся сигнальной последовательностью из 20 аминокислот) показана в SEQ ID NO: 4. Непроцессированный мышинный IL-2 дополнительно содержит N-концевой сигнальный пептид из 20 аминокислот (SEQ ID NO: 3), который отсутствует в молекуле зрелого IL-2; см. также фиг. 2A и 2B. Под "нативным IL-2", который также называют "IL-2 дикого типа", подразумевают встречающийся в природе или рекомбинантный IL-2.

Известны дополнительные последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот для IL-2; см., например, регистрационные номера GenBank: Q7JFM2 (*Aotus lemurinus* (панамская мирикина)); Q7JFM5 (*Aotus nancymaae* (западноамазонская мирикина)); P05016 (*Bos taurus* (корова)); Q29416 (*Canis familiaris* (собака) (*Canis lupus familiaris*)); P36835 (*Capra hircus* (коза)) и P37997 (*Equus caballus* (лошадь)).

Кроме того, предусмотрены биологически активные фрагменты и варианты IL-2. Такие активные варианты или фрагменты IL-2 будут сохранять активность IL-2. Фраза "биологическая активность IL-2" относится к одной или нескольким биологическим активностям IL-2, включая в себя без ограничения способность стимулировать несущие рецептор IL-2 лимфоциты. Такую активность можно измерить как *in vitro*, так и *in vivo*. TL-

2 представляет собой глобальный регулятор иммунной активности, и эффекты, наблюдаемые здесь, являются суммой таких активностей. Например, он регулирует активность выживаемости (Bcl-2), индуцирует активность Т-эффекторов (IFN-гамма, гранзим В и перфорин) и стимулирует Т-регуляторную активность (FoxP3); см., например, Malek et al. (2010) *Immunity* 33(2): 153-65, полностью включенную в настоящий документ посредством ссылки.

Известны биологически активные варианты IL-2; см., например, публикации заявок на выдачу патента США №№ 20060269515 и 20060160187 и международную патентную публикацию WO 99/60128, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

Биологически активные фрагменты и варианты IL-2 можно использовать в слитых белках, раскрытых в настоящем документе. Такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150 или больше непрерывных аминокислот согласно SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4. Альтернативно, функциональный вариант может характеризоваться по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности относительно последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

Кроме того, предусмотрены активные варианты и фрагменты полинуклеотидов, кодирующих белки IL-2. Такой полинуклеотид может содержать по меньшей мере 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 непрерывных нуклеотидов полипептида, кодирующего SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4, и продолжать кодировать белок, характеризующийся активностью IL-2. Альтернативно, функциональный полинуклеотид может характеризоваться по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или

99% идентичностью последовательности относительно полипептида, кодирующего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4, и продолжать кодировать функциональный полипептид IL-2.

ii. Рецептор интерлейкина-2 альфа.

Используемый в настоящем документе термин "CD25", или "рецептор α IL-2", или "IL-2Rα" относится к любому нативному или рекомбинантному IL-2Rα из любого источника, относящегося к позвоночному животному, включая в себя млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), и одомашненных или сельскохозяйственных млекопитающих, если не указано иное. Термин также предусматривает встречающиеся в природе варианты IL-2Rα, например, сплайс-варианты или аллельные варианты, или не встречающиеся в природе варианты. IL-2 человека проявляют свои биологические эффекты посредством передачи сигнала через свою рецепторную систему, IL-2R. IL-2 и его рецептор (IL-2R) необходимы для Т-клеточной пролиферации и других фундаментальных функций, которые являются критически важными для иммунного ответа. IL-2R состоит из 3 нековалентно связанных трансмембранных белков I типа, которые представляют собой альфа (p55), бета (p'75) и гамма (p65) цепи. Альфа цепь IL-2R человека содержит внеклеточный домен из 219 аминокислот, трансмембранный домен из 19 аминокислот и внутриклеточный домен из 13 аминокислот. Секретированный внеклеточный домен IL-2R альфа (IL-2Rα) можно использовать в слитых белках, описанных в настоящем документе.

Аминокислотная последовательность иллюстративной зрелой формы IL-2Rα человека показана в SEQ ID NO: 6. Непроцессированный IL-2Rα человека показан в SEQ ID NO: 5. Внеклеточный домен SEQ ID NO: 6 представлен в SEQ ID NO: 7. Аминокислотная последовательность иллюстративной зрелой формы мышиного IL-2Rα показана в SEQ ID NO: 9. Непроцессированный мышиный IL-2Rα показан в SEQ ID NO: 8. Внеклеточный домен SEQ ID NO: 9 представлен в SEQ ID NO: 10. Под "нативным IL-2Rα", который также называется "IL-2Rα дикого типа", подразумевают встречающийся в природе или рекомбинантный IL-2Rα. Последовательность нативной молекулы IL-2Rα человека показана в SEQ ID NO: 5 и 6.

Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности для IL-2Rα являются известными; см., например, регистрационные номера GenBank: NP 001030597.1 (P.troglodytes); NP 001028089.1 (M.mulatta); NM 001003211.1 (C.lupus); NP 776783.1 (B. to/rasj; NP_032393.3 (M.musculis); HNP_037295.1 (R.norvegicus), каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Также предусмотрены биологически активные фрагменты и варианты внеклеточного домена IL-2Rα. Такие активные варианты или фрагменты внеклеточного домена IL-2Rα будут сохранять активность внеклеточного домена IL-2Rα. Фраза "биологическая активность внеклеточного домена IL-2Rα" относится к одной или нескольким биологическим активностям внеклеточного домена IL-2Rα, включая в себя без ограничения способность усиливать внутриклеточную передачу сигнала в реагирующих на рецептор IL-2 клетках. Неограничивающие примеры биологически активных фрагментов и вариантов IL-2Rα раскрыты, например, в Robb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5654-5658, 1988, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Биологически активные фрагменты и варианты внеклеточного домена IL-2Rα можно использовать в слитых белках, раскрытых в настоящем документе. Такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 215 или больше непрерывных аминокислот внеклеточного домена согласно любой из SEQ ID NO: 6, 9, 7, 10, 5 или 8. Альтернативно, функциональный вариант может характеризоваться по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности относительно последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, 9, 7, 10, 5 или 8.

Согласно одному варианту осуществления слитые белки, предусмотренные в настоящем документе, могут содержать по меньшей мере одну мутацию в пределах внеклеточного домена IL-2Rα. Согласно конкретному варианту осуществления аргинин в положении 35 IL-2Rα можно мутировать до треонина и/или аргинин в положении 36 IL-2Rα можно мутировать до серина. Такой слитый белок может характеризоваться увеличенной активностью IL-2 по сравнению со слитым белком, не содержащим указанные мутации во внеклеточном домене IL-2Rα, и/или по сравнению с нативным или рекомбинантным IL-2. Аминокислотные последовательности иллюстративных слитых белков, содержащих IL-2Rα с мутациями в пределах внеклеточного домена IL-2Rα, представлены в SEQ ID NOS: 62 и 64. Согласно одному варианту осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 62 или 64; или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичностью относительно любой из SEQ ID NO: 62 или 64.

Кроме того, предусмотрены активные варианты и фрагменты полинуклеотидов, кодирующих внеклеточный домен IL-2Rα. Такой полинуклеотид может содержать по меньшей мере 100, 200, 300, 400, 500, 600 или больше непрерывных нуклеотидов полипептида, кодирующего SEQ ID NO: 6, 9, 7, 10, 5 или 8, и продолжать кодировать белок, характеризующийся активностью внеклеточного домена IL-2Rα. Аль-

тернативно, функциональный полинуклеотид может характеризоваться по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности относительно полипептида, кодирующего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, 9, 7, 10, 5 или 8, и продолжать кодировать белок, характеризующийся активностью внеклеточного домена IL-2R α .

iii. Дополнительные компоненты.

Слитые белки IL-2/IL-2R α могут дополнительно содержать дополнительные элементы. Такие элементы могут способствовать экспрессии слитого белка, способствовать секреции слитого белка, улучшать стабильность слитого белка, обеспечивать более эффективную очистку белка и/или модулировать активность слитого белка.

"Гетерологичный" со ссылкой на полипептид или полинуклеотид представляет собой полипептид или полинуклеотид, который происходит из отличающегося белка или полинуклеотида. Дополнительные компоненты слитого белка могут происходить из одного и того же организма, что и другие полипептидные компоненты слитого белка, или дополнительные компоненты могут происходить из другого организма, чем другие полипептидные компоненты слитого белка.

Согласно одному варианту осуществления слитый белок IL-2/IL-2R α содержит линкерную последовательность, расположенную между полипептидом IL-2 и полипептидом IL-2R α . Линкер может характеризоваться любой длиной и может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50 или 60 или больше аминокислот. Согласно одному варианту осуществления линкерная последовательность содержит аминокислотные остатки глицина. В других случаях линкерная последовательность содержит комбинацию аминокислотных остатков глицина и серина. Такие глицин/сериновые линкеры могут содержать любую комбинацию аминокислотных остатков, включая в себя без ограничения пептид GGGS или GGGGS или их повторы, включая в себя 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше повторов указанных данных пептидов. Например, линкерные последовательности могут содержать GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 13) (также обозначенную как (Gly₃Ser)₃); GGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 11) (также обозначенную как (Gly₃Ser)₄); или (Gly₃Ser)₅; (Gly₃Ser)₆; (Gly₃Ser)₇ и т.д. Линкерные последовательности могут дополнительно содержать (Gly₄Ser)₃, как представлено в SEQ ID NO: 50; GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 40) (также обозначенную как (Gly₄Ser)₄); GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41) (также обозначенную как (Gly₄Ser)₅); (Gly₄Ser)₂, (Gly₄Ser)₁, (Gly₄Ser)₆; (Gly₄Ser)₇; (Gly₄Ser)₈ и т.д. Кроме того, активные варианты и фрагменты любого линкера можно дополнительно использовать в слитом белке, раскрытом в настоящем документе.

Кроме того, следует отметить, что полинуклеотид, кодирующий слитый белок IL-2/IL-2R α , может содержать дополнительные элементы, которые способствуют трансляции слитого белка. Такие последовательности включают в себя, например, последовательности Kozak, прикрепленные к 5' концу полинуклеотида, кодирующего слитый белок. Консенсусная последовательность Kozak представляет собой последовательность, которая встречается на эукариотической иРНК, которая играет роль в инициации процесса трансляции и содержит консенсус (gcc)gccRecAUGG (SEQ ID NO: 35); причем (1) строчная буква обозначает наиболее часто встречающееся основание в положении, где основание может, тем не менее, изменяться; (2) прописные буквы указывают на высококонсервативные основания, т.е. последовательность 'AUGG' является постоянной или редко, если вообще меняется, при этом исключением является неоднозначный код IUPAC 'R', который указывает на то, что пурин (аденин или гуанин), как правило, наблюдается в этом положении; и (3) последовательность в скобках ((gee)) обладает неясным значением. Согласно одному варианту осуществления последовательность Kozak содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53.

Согласно одному неограничивающему варианту осуществления слитый белок IL-2/IL-2R α содержит лидерную оптимизированную последовательность Kozak IL-2, как представлено в SEQ ID NO: 28, или ее функциональный вариант или фрагмент. Функциональный вариант или фрагмент последовательности Kozak будет сохранять способность увеличивать трансляцию белка по сравнению с уровнем трансляции из последовательности, в которой отсутствует лидерная последовательность. Такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 непрерывных нуклеотидов последовательности Kozak или последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28 или 53. Альтернативно, функциональный вариант может характеризоваться по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности относительно последовательности Kozak или последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28 или 53.

Согласно дополнительным вариантам осуществления слитый белок IL-2/IL-2R α содержит одну или несколько меток на С-конце для содействия в очистке полипептида. Такие метки являются известными, и включают в себя, например, гистидиновую метку. Согласно конкретным вариантам осуществления используют метку 6X His. Следует дополнительно отметить, что дополнительную линкерную последовательность можно использовать между слитым белком и меткой His.

Неограничивающий вариант осуществления слитого белка IL-2/IL-2R α представлен на фиг. 1, фиг. 2A и 2B. Такой слитый белок содержит лидерный пептид, IL-2 или его функциональный вариант или фрагмент, вариабельный линкер, IL-2R α , глициновый линкер, метку 6x His и два терминирующих кодона.

iv. Варианты и фрагменты.

a. Полинуклеотиды.

Фрагменты и варианты полинуклеотидов, кодирующих слитый белок IL-2/внеклеточный домен IL-2R α или различные компоненты, содержащиеся в них (т.е. внеклеточный домен IL-2R α , полипептиды IL-2R α , линкерные последовательности и/или последовательности Kozak) можно использовать в различных способах и композициях согласно настоящему изобретению. Под "фрагментом" подразумевают часть полинуклеотида и, следовательно, белка, кодируемого им, или часть полипептида. Фрагменты полинуклеотида могут кодировать белковые фрагменты, которые сохраняют биологическую активность нативного белка и, следовательно, характеризуются активностью IL-2, активностью внеклеточного домена IL-2R α , активностью слитого белка IL-2/IL-2R α , или если кодируют линкерную последовательность, обеспечивают требуемую активность слитого белка IL-2/IL-2R α .

Биологически активную часть внеклеточного домена IL-2R α , полипептида IL-2, слитого белка IL-2/IL-2R α , последовательности Kozak или линкерной последовательности можно получить путем выделения части одного из полинуклеотидов, кодирующих часть внеклеточного домена IL-2R α или полипептида IL-2, и экспрессии кодируемой части полипептида (например, путем рекомбинантной экспрессии *in vitro*), и оценки активности части внеклеточного домена IL-2R α и/или полипептида IL-2 или активности слитого белка IL-2/IL-2R α .

"Вариантные" последовательности характеризуются высокой степенью сходства последовательностей. Для полинуклеотидов консервативные варианты включают в себя такие последовательности, которые, вследствие вырожденности генетического кода, кодируют аминокислотную последовательность одного из полипептидов внеклеточного домена IL-2R α , полипептидов IL-2, слитых белков IL-2/IL-2R α или линкерных последовательностей. Такие варианты можно идентифицировать с использованием хорошо известных техник молекулярной биологии, как, например, техники полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации. Вариантные полинуклеотиды также включают в себя синтетически полученные нуклеотидные последовательности, такие как последовательности, созданные, например, с использованием сайт-направленного мутагенеза, но которые все еще кодируют внеклеточный домен IL-2R α , полипептид IL-2, слитый белок IL-2/IL-2R α , последовательность Kozak или линкерную последовательность.

b. Полипептиды.

Под "вариантным" белком подразумевают белок, полученный из нативного белка путем делеции (так называемого усечения) или добавления одной или нескольких аминокислот к N-концу и/или C-концу нативного белка; делеции или добавления одной или нескольких аминокислот на одном или нескольких сайтах в нативном белке; или замены одной или нескольких аминокислот на одном или нескольких сайтах в нативном белке. Вариантные белки являются биологически активными, иными словами, они продолжают обладать требуемой биологической активностью, а именно, активностью слитого белка IL-2/IL-2R α , активностью IL-2 или активностью внеклеточного домена IL-2R α . Такие варианты могут являться результатом, например, генетического полиморфизма или манипуляции человека. Биологически активные варианты слитого белка IL-2/IL-2R α или любого из его компонентов (т.е. полипептид внеклеточного домена IL-2R α , полипептид IL-2 или линкерная последовательность) будут характеризоваться по меньшей мере приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичностью последовательности относительно аминокислотной последовательности нативного белка, что определяли с помощью программ и параметров выравнивания последовательностей, описанных в другом месте в настоящем документе. Биологически активный вариант белка может отличаться от такого белка на не более чем 1-15 аминокислотных остатков, не более чем 1-10, например, 6-10, не более чем 5, не более чем 4, 3, 2 или даже 1 аминокислотный остаток.

Белки можно изменить различными путями, включая в себя аминокислотные замены, делеции, усечения и вставки. Способы таких манипуляций, как правило, известны в настоящей области техники. Например, варианты аминокислотной последовательности внеклеточного домена IL-2R α , полипептида IL-2, слитого белка IL-2/IL-2R α или линкерные последовательности можно получить с помощью мутаций в ДНК. Способы мутагенеза и изменений нуклеотидных последовательностей хорошо известны в настоящей области техники; см., например, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; патент США № 4873192; Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York) и процитированные в них ссылки. Руководства в отношении соответствующих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность представляющего интерес белка, можно найти в модели Dayhoff et al. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), включенный в настоящий

документ посредством ссылки. Консервативные замены, такие как обмен одной аминокислоты на другую, характеризующуюся сходными свойствами, могут являться предпочтительными.

Таким образом, раскрытые в настоящем документе полинуклеотиды могут включать в себя встречающиеся в природе последовательности, "нативные" последовательности, а также мутантные формы. Аналогично, белки, используемые в способах согласно настоящему изобретению, включают в себя встречающиеся в природе белки, а также их вариации и модифицированные формы. Такие варианты будут продолжать обладать способностью осуществлять событие рекомбинации. Как правило, мутации, произведенные в полинуклеотиде, кодирующем вариантный полипептид, не должны помещать последовательность за пределы рамки считывания и/или создавать комплементарные области, которые могут производить вторичную структуру иРНК; см., публикацию заявки на выдачу европейского патента № 75444.

Вариантные полинуклеотиды и белки также включают в себя последовательности и белки, полученные из мутагенной и рекомбинантной процедуры, такой как перестановка в ДНК. С помощью такой процедуры один или несколько различных кодирующих внеклеточных доменов IL-2R α или IL-2 последовательностей можно подвергнуть манипуляции для создания новых полипептидов внеклеточного домена IL-2R α или IL-2, обладающих требуемыми свойствами. Сходным образом, библиотеки рекомбинантных полинуклеотидов создают из популяции полинуклеотидов родственных последовательностей, содержащих области последовательностей, которые характеризуются существенной идентичностью последовательностей, и которые можно гомологично рекомбинировать *in vitro* или *in vivo*. Стратегии такой перестановки в ДНК известны в настоящей области техники; см., например, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291; и патенты США №№ 5605793 и 5837458.

III. Полинуклеотиды, кодирующие слитые белки IL-2/IL-2R α , и способы получения.

Композиции дополнительно включают в себя выделенные полинуклеотиды, который кодируют различные описанные в настоящем документе выше слитые белки и их варианты и фрагменты. Дополнительно раскрыты векторы и экспрессионные кассеты, содержащие полинуклеотиды, описанные в настоящем документе. Экспрессионные кассеты, как правило, будут включать в себя промотор, функционально связанный с полинуклеотидом и областью терминирования транскрипции и трансляции.

Применение термина "полинуклеотид" не подразумевает ограничение настоящего изобретения полинуклеотидами, содержащими ДНК. Специалистам в настоящей области техники будет понятно, что полинуклеотиды могут содержать рибонуклеотиды и комбинации рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов. Такие дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды включают в себя как встречающиеся в природе молекулы, так и синтетические аналоги.

"Выделенный" или "очищенный" полинуклеотид или белок или его биологически активная часть по существу или главным образом не содержат компоненты, которые в норме сопровождают или взаимодействуют с полинуклеотидом или белком, обнаруженным в своем встречающемся в природе окружении. Таким образом, выделенный или очищенный полинуклеотид или белок по существу не содержит другой клеточный материал или среду культивирования, если он получен с помощью рекомбинантных техник, или по существу не содержит химические предшественники или другие химические средства, если его получают химически. Оптимально, если "выделенный" полинуклеотид не содержит последовательности (оптимально кодирующие белок последовательности), которые в природном состоянии фланкируют полинуклеотид (т.е. последовательности, расположенные на 5' и 3' концах полинуклеотида) в геномной ДНК организма, из которого получен полинуклеотид. Например, согласно различным вариантам осуществления выделенный полинуклеотид может содержать меньше чем приблизительно 5 т.п.н., 4 т.п.н., 3 т.п.н., 2 т.п.н., 1 т.п.н., 0.5 т.п.н. или 0.1 т.п.н. нуклеотидной последовательности, которая в природном состоянии фланкирует полинуклеотид в геномной ДНК клетки, из которой получен полинуклеотид. Белок, который по существу не содержит клеточный материал, включает в себя препараты белка, содержащие меньше чем приблизительно 30%, 20%, 10%, 5% или 1% (на сухую массу) белка-примеси. Если белок согласно настоящему изобретению или его биологически активная часть получены рекомбинантно, оптимально, чтобы среда культивирования представляла меньше чем приблизительно 30%, 20%, 10%, 5% или 1% (на сухую массу) химических предшественников или химических средств, не являющихся представляющим интерес белком.

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

Кроме того, в настоящем документе предусмотрен вектор, который содержит вышеописанные полинуклеотиды, функционально связанные с промотором. Нуклеотидная последовательность является "функционально связанной" в контролирующей экспрессию последовательностью (например, промотором), если контролирующая экспрессию последовательность контролирует и регулирует транскрипцию и трансляцию указанной последовательности. Термин "функционально связанный" при ссылке на нуклеотидную последовательность, включает в себя наличие соответствующего старт-сигнала (например, ATG) перед подлежащей экспрессии нуклеотидной последовательностью и поддержание правильной рамки считывания для обеспечения экспрессии последовательности под контролем контролирующей экспрессию последовательности и получение требуемого продукта, кодируемого последовательностью. Если ген, который необходимо вставить в рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, не содержит соответствующий старт-сигнал, такой старт-сигнал можно ввести перед геном. "Вектор" представляет собой репликон, такой как плазмида, фаг или космида, к которому можно прикрепить другой сегмент нуклеиновой кислоты так, чтобы привести к репликации прикрепленного сегмента. Промотор может представлять собой или может являться идентичным бактериальному, дрожжевому промотору, промотору насекомого или млекопитающего. Кроме того, вектор может представлять собой плазмиду, космиду, дрожжевую искусственную хромосому (YAC), бактериофаг или эукариотическую вирусную ДНК.

Можно использовать другие различные векторные остоны, известные в настоящей области техники как применимые для экспрессии белка. Такие векторы включают в себя без ограничения следующее: аденовирус, вакуолизирующий обезьяний вирус 40 (SV40), цитомегаловирус (CMV), вирус опухоли молочной железы мышей (MMTV), вирус мышинного лейкоза Молони, системы доставки ДНК, т.е. липосомы и системы доставки экспрессионных плазмид. Кроме того, один класс векторов содержит элементы ДНК, происходящие из таких вирусов, как вирус папилломы крупного рогатого скота, полиомавирус, бакуловирус, ретровирусы или вирус леса Семлики. Такие векторы можно получить коммерчески или осуществить их сборку из описанных последовательностей с помощью способов, хорошо известных в настоящей области техники.

В настоящем документе предусмотрена векторная система-хозяин для получения полипептида, которая содержит вектор подходящей клетки-хозяина. Подходящие клетки-хозяева включают в себя без ограничения прокариотические или эукариотические клетки, например, бактериальные клетки (включая в себя грамположительные клетки), дрожжевые клетки, грибковые клетки, клетки насекомых и клетки животных. Многочисленные клетки млекопитающих можно использовать в качестве хозяев, включая в себя без ограничения мышинные фибробласты NIH 3T3, клетки CHO, клетки HeLa, клетки Ltk и т.д. Также можно использовать дополнительные клетки животных, такие как клетки R1.1, B-W и L-M, клетки почки африканской зеленой обезьяны (например, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 и BMT10), клетки насекомых (например, Sf9) и клетки человека и растительные клетки в тканевой культуре.

Широкое разнообразие комбинаций хозяев/экспрессионных векторов можно использовать в экспрессии полинуклеотидных последовательностей, представленных в настоящем документе. Применимые экспрессионные векторы, например, могут состоять из сегментов хромосомных, нехромосомных и синтетических последовательностей ДНК. Подходящие векторы включают в себя производные SV40 и известные бактериальные плазмиды, например, плазмиды *is. coli* col E1, pCR1, pBR322, pMB9 и их производные, такие плазмиды, как RP4; фаговые ДНК, например, многочисленные производные фага X, например, NM989, и другие фаговые ДНК, например, ДНК M13 и одноцепочечная ДНК нитевидного фага; такие дрожжевые плазмиды, как плазмида 21A или ее производные; векторы, применимые в эукариотических клетках, такие как векторы, применимые в клетках насекомых или млекопитающих; векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговых ДНК, такие как плазмиды, которые были модифицированы для использования фаговой ДНК или других контролирующих экспрессию последовательностей; и подобное.

Любую из широкого разнообразия контролирующих экспрессию последовательностей (последовательностей, которые контролируют экспрессию нуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней) можно использовать в указанных векторах для экспрессии полинуклеотидных последовательностей, предусмотренных в настоящем документе. Такие применимые контролирующие экспрессию последовательности включают в себя, например, ранние или поздние промоторы SV40, CMV, вируса осповакцины, полиомы или аденовируса, систему *lac*, систему *trp*, систему TAC, систему TRC, систему LTR, главные операторные и промоторные области фага κ , контролирующие области оболочечного белка fd, промотор для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы (например, *Pho5*), промоторы дрожжевых факторов α -скречивания и другие последовательности, которые, как известно, контролируют экспрессию генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов, и различные их комбинации.

Следует понимать, что не все векторы, контролирующие экспрессию последовательности и хозяева, будут функционировать в равной степени хорошо для экспрессии полинуклеотидных последовательностей, предусмотренных в настоящем документе. Никогда все хозяева не будут функционировать в равной степени хорошо с одной и той же экспрессионной системой. Тем не менее, специалист в настоящей области техники сможет выбрать правильные векторы, контролирующие экспрессию последовательности

сти и хозяев без чрезмерного экспериментирования для достижения требуемой экспрессии, не отклоняясь от объема настоящего изобретения. Например, в выборе вектора необходимо принимать во внимание хозяина, поскольку вектор должен в нем функционировать. Также необходимо учитывать число копий вектора, способность контролировать указанное число копий и экспрессию любых других белков, кодируемых вектором, таких как относящиеся к антибиотикам маркеры.

В выборе контролирующей экспрессию последовательности, как правило, будут учитывать разнообразные факторы. Они включают в себя, например, относительную эффективность системы, ее способность осуществлять контроль и ее совместимость с конкретной нуклеотидной последовательностью или геном, подлежащим экспрессии, в частности, в отношении потенциальных вторичных структур. Подходящих одноклеточных хозяев будут выбирать, принимая во внимание, например, их совместимость с выбранным вектором, их характеристики секреции, их способность к правильной укладке белков и их требования к ферментации, а также токсичность в отношении хозяина продукта, кодируемого нуклеотидными последовательностями, подлежащими экспрессии, и простоту очистки продуктов экспрессии.

В получении экспрессионной кассеты можно провести манипуляции с различными полинуклеотидами так, чтобы обеспечить полинуклеотидные последовательности в правильной ориентации и, в соответствующей ситуации, в правильной рамке считывания. Для достижения указанного можно использовать адаптеры или линкеры для соединения полинуклеотидов, или можно применять другие манипуляции для обеспечения удобных сайтов рестрикции, удаления излишней ДНК, удаления сайтов рестрикции или подобного. Например, такие линкеры, как два глицина, можно добавить между полипептидами. Остатки метионина, кодируемые нуклеотидными последовательностями *atg*, можно добавить для обеспечения инициации транскрипции гена. С этой целью можно использовать *in vitro* мутагенез, восстановление праймера, рестрикцию, отжиг, повторные замены, например, транзиции и трансверсии.

Дополнительно предусмотрен способ получения полипептида, который предусматривает экспрессию полинуклеотида, кодирующего слитый белок, раскрытый в настоящем документе, в клетке-хозяине при подходящих условиях, обеспечивающих возможность получения полипептида, и выделение полипептида, полученного таким образом.

IV. Способы применения.

Предусмотрены различные способы модулирования иммунного ответа. Используемый в настоящем документе термин "модулирование" включает в себя индукцию, ингибирование, потенцирование, повышения, увеличения или уменьшения данной активности или ответа.

Под "субъектом" подразумевают млекопитающих, например, приматов, людей, сельскохозяйственных и одомашненных животных, таких как без ограничения собаки, кошки, крупный рогатый скот, лошади, свиньи, овцы и подобное. Согласно одному варианту осуществления субъект, подвергающийся лечению с помощью фармацевтических составов, предусмотренных в настоящем документе, представляет собой человека.

"Терапевтически эффективное количество" слитого белка IL-2/IL-2R α относится к количеству слитого белка IL-2/IL-2R α , достаточному для того, чтобы вызвать требуемый биологический ответ. Специалисту в настоящей области техники будет понятно, что абсолютное количество конкретного слитого белка IL-2/IL-2R α , которое является эффективным, может варьировать в зависимости от таких факторов, как требуемый биологический конечный результат, подлежащий доставке слитый белок IL-2/IL-2R α , целевая клетка или ткань и подобное. Кроме того, специалисту в настоящей области техники будет понятно, что эффективное количество можно ввести в одной дозе или оно может быть достигнуто путем введения многократных доз (т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше доз).

i. Способы увеличения иммунного ответа.

Предусмотрены различные способы увеличения иммунного ответа у субъекта. Такие способы предусматривают введение субъекту, нуждающемуся в увеличении иммунного ответа, терапевтически эффективного количества слитого белка IL-2/IL-2R α . В связи с этим, согласно конкретным вариантам осуществления временное применение высоких доз IL-2 используют для стимуляции ответов иммунных эффекторов и клеток памяти.

Следует дополнительно отметить, что различные слитые белки IL-2/IL-2R α можно использовать в комбинации с антигеном для усиления иммунного ответа на антиген. Таким образом, слитый белок IL-2/IL-2R α также можно использовать в качестве адъюванта вакцины для стимуляции клеточно-опосредованной иммунной памяти.

Например, слитый белок IL-2/IL-2R α можно использовать для улучшения препарата вакцины. Таким образом, различные слитые белки IL-2/IL-2R α являются применимыми для увеличения эффективности противораковых вакцин или для вакцин, которые являются слабоиммуногенными. Дополнительно предусмотрены способы усиления эффективности или иммуногенности вакцины у субъекта или преодоления подавленного иммунного ответа на вакцину у субъекта, включая в себя (i) введение субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка IL-2/IL-2R α и (ii) введение субъекту вакцины.

Под "вакциной" подразумевают композицию, применимую для стимуляции специфического иммунного ответа (или иммуногенного ответа) у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления

иммуногенный ответ является защитным или обеспечивает защитный иммунитет. Например, в случае болезнетворного микроорганизма вакцина обеспечивает субъекту возможность лучше противостоять инфекции или прогрессированию заболевания, вызванного организмом, против которого направлена вакцина. Альтернативно, в случае злокачественной опухоли вакцина усиливает естественные защитные силы субъекта против злокачественных опухолей, которые уже развились. Указанные типы вакцин также могут предотвращать дальнейший рост существующих злокачественных опухолей, предотвращать рецидив получивших лечение злокачественных опухолей и/или устранять злокачественные клетки, не уничтоженные предыдущими видами лечения.

Репрезентативные вакцины включают в себя без ограничения вакцины против дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита, кори, эпидемического паротита, краснухи, гепатита В, *Haemophilus influenzae* типа b, ветряной оспы, менингита, вируса иммунодефицита человека, туберкулеза, вируса Эпштейна-Барр, малярии, гепатита Е, лихорадки денге, ротавируса, герпеса, вируса папилломы человека и злокачественных опухолей. Представляющие интерес вакцины включают в себя две вакцины, которые получили лицензию Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США для профилактики вирусных инфекций, которые могут привести к злокачественным опухолям: вакцина против гепатита В, которая предотвращает инфекцию вируса гепатита В, инфекционного агента, связанного со злокачественной опухолью печени (MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 46:107-09, 1997); и Gardasil™, который предотвращает инфекцию двух типов вируса папилломы человека, которые вместе вызывают 70 % злокачественных опухолей шейки матки во всем мире (Speck and Tying, Skin Therapy Lett. 11:1-3, 2006). Другие представляющие интерес терапевтические вакцины включают в себя терапевтические вакцины для лечения злокачественной опухоли, злокачественной опухоли шейки матки, фолликулярной В-клеточной неходжкинской лимфомы, злокачественной опухоли почек, меланомы кожи, меланомы сетчатки глаза, злокачественной опухоли предстательной железы и множественной миеломы.

Под "усилением эффективности" или "усилением иммуногенности" в отношении вакцины подразумевают улучшение результата лечения, например, согласно измерению изменения конкретной величины, например, увеличение или уменьшение конкретного параметра активности вакцины, связанного с защитным иммунитетом. Согласно одному варианту осуществления усиление относится по меньшей мере к 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или больше чем 100% увеличению конкретного параметра. Согласно другому варианту осуществления усиление относится по меньшей мере к 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или больше чем 100% уменьшению конкретного параметра. Согласно одному примеру усиление эффективности/иммуногенности вакцины относится к увеличению способности вакцины ингибировать или лечить прогрессирование заболевания, такому как по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или больше чем 100% увеличению эффективности вакцины для указанной цели. Согласно дополнительному примеру усиление эффективности/иммуногенности вакцины относится к увеличению способности вакцины мобилизовать естественные защитные силы субъекта против злокачественных опухолей, которые уже развились, такому как по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или больше чем 100% увеличение эффективности вакцины для указанной цели.

Аналогично, под "преодолением подавленного иммунного ответа" в отношении вакцины подразумевают улучшение результата лечения, например, согласно измерению изменения конкретной величины, например, возвращение к ранее положительному значению конкретного параметра активности вакцины, связанного с защитным иммунитетом. Согласно одному варианту осуществления преодоление относится по меньшей мере к 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или больше чем 100% увеличению конкретного параметра. Согласно одному примеру преодоление подавленного иммунного ответа на вакцину относится к возобновленной способности вакцины ингибировать или лечить прогрессирование заболевания, такой как по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, или больше чем 100% возобновление эффективности вакцины для указанной цели. Согласно дополнительному примеру преодоление подавленного иммунного ответа на вакцину относится к возобновленной способности вакцины мобилизовать естественные защитные силы субъекта против злокачественных опухолей, которые уже развились, такой как по меньшей мере 25%, 50%, 100% или больше чем 100% возобновление эффективности вакцины для указанной цели.

Под "терапевтически эффективным количеством" подразумевают количество, которое является применимым в лечении, профилактике или диагностике заболевания или состояния. Используемое в настоящем документе терапевтически эффективное количество слитого белка IL-2/IL-2R α представляет собой количество, которое при введении субъекту является достаточным для достижения требуемого эффекта, такого как модулирование иммунного ответа у субъекта, не вызывая существенного цитотоксического эффекта у субъекта. Как указано выше, терапевтически эффективное количество слитого белка IL-2/IL-2R α можно вводить субъекту для увеличения иммунного ответа, усиления иммунного ответа на антиген, усиления эффективности или иммуногенности вакцины у субъекта или преодоления подавленного иммунного ответа на вакцину. Эффективное количество слитого белка IL-2/IL-2R α , применимого для модулирования таких функций, будет зависеть от подлежащего лечению субъекта, тяжести повреждения и способа введения слитого белка IL-2/IL-2R α . Иллюстративные дозы включают в себя приблизительно 10^4 - приблизительно 10^7 МЕ (международных единиц) активности IL-2 на организм взрослого

человека, приблизительно 10^4 - 10^5 МЕ активности IL-2 на организм взрослого человека, приблизительно 10^5 - приблизительно 10^6 МЕ активности IL-2 на организм взрослого человека, приблизительно 10^6 - приблизительно 10^7 МЕ активности IL-2 на организм взрослого человека. В других случаях терапевтически эффективная доза слитого белка IL-2/IL-2R α составляет приблизительно 10^5 МЕ активности IL-2 $\pm$ 100-кратная, составляет приблизительно 10^5 МЕ активности IL-2 $\pm$ 10-кратная, приблизительно 10^5 МЕ активности IL-2 $\pm$ 2-кратная, приблизительно 10^5 МЕ активности IL-2 $\pm$ 20-кратная, приблизительно 10^5 МЕ активности IL-2 $\pm$ 30-кратная, приблизительно 10^5 МЕ активности IL-2 $\pm$ 40-кратная, приблизительно 10^5 МЕ активности IL-2 $\pm$ 50-кратная, приблизительно 10^5 МЕ активности IL-2 $\pm$ 60-кратная, приблизительно 10^5 МЕ активности IL-2 $\pm$ 70-кратная, приблизительно 10^5 МЕ активности IL-2 $\pm$ 80-кратная или приблизительно 10^5 МЕ активности IL-2 $\pm$ 90-кратная. Согласно конкретному неограничивающему варианту осуществления слитый белок IL-2 человека вводят в указанной дозировке.

Согласно одному варианту осуществления стандартный образец для мышинового слитого белка IL-2 представляет собой мышинный IL-2 от eBiosciences (№ по кат.: 14-8021).

Кратко, биоактивность мышинового IL-2 от eBioscience является следующей: значение ED50 указанного белка, измеряемое с помощью анализа клеточной пролиферации CTLL-2, меньше чем или равно 175 пг/мл. Это соответствует специфической активности, составляющей больше чем или равной $5,7 \times 10^6$ единиц/мг.

Согласно другому варианту осуществления стандартный образец для слитого белка IL-2 человека представляет собой лекарственное средство IL-2 человека, альдеслейкин (Пролейкин). Таким образом, раскрытые в настоящем документе слитые белки IL-2 напрямую сравнивают со слитым белком с лекарственным средством IL-2, которое используют в низкодозовой или высокодозовой терапии IL-2. В определении активности IL-2 для IL-2 мыши и человека используют одинаковый анализ, и их активность в единицах/мг является сходной. В отношении лекарственного средства IL-2 человека, т.е. альдеслейкина (Пролейкина), стандартная величина количества IL-2 представляет собой Международные Единицы (МЕ, или IU), которые технически не представляют собой фиксированное количество, а количество, которое производит фиксированный эффект в конкретном анализе биологической активности, т.е. анализе пролиферации CTLL. На практике производство IL-2 стандартизировано, и существует превращение массой лекарственного средства в международные единицы. Оно представляет собой следующее: 1,1 мг IL-2 = 18 млн. МЕ (сокращенно 18 MME).

Кроме того, следует понимать, что соответствующие дозы функционального средства зависят от эффективности активного средства в отношении активности, подлежащей модулированию. Такие соответствующие дозы можно определить с использованием анализов, описанных в настоящем документе. Кроме того, следует понимать, что конкретный уровень дозы для любого конкретного субъекта-животного будет зависеть от разнообразных факторов, включая в себя активность используемого конкретного соединения, возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и диету субъекта, время введения, путь введения, скорость выведения и/или любую комбинацию лекарственных средств.

Если введение осуществляют с целью лечения, введение может происходить либо для профилактической, либо для терапевтической цели. Если предусмотрено профилактическое введение, вещество вводят до какого-либо симптома, профилактическое введение вещества служит для предотвращения или ослабления какого-либо последующего симптома. Если предусмотрено терапевтическое введение, вещество вводят при (или вскоре после) возникновения симптома. Терапевтическое введение вещества служит для ослабления любого существующего симптома.

Специалисту в настоящей области техники будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозировку, необходимую для эффективного лечения субъекта, включая в себя без ограничения тяжесть заболевания или нарушения, предыдущие виды лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие присутствующие заболевания. Более того, лечение субъекта с помощью терапевтически эффективного количества слитого белка IL-2/IL-2R α может предусматривать однократное лечение или предпочтительно может предусматривать серию введений. Также следует понимать, что эффективная дозировка слитого белка IL-2/IL-2R α , используемого для лечения, может увеличиваться или уменьшаться с течением курса конкретного лечения. Изменения в дозировке могут являться результатом и становиться очевидными из результатов диагностических анализов, описанных в настоящем документе.

Терапевтически эффективные количества слитого белка IL-2/IL-2R α можно определить с помощью исследований на животных. При использовании анализов на животных дозировку вводят для обеспечения целевой *in vivo* концентрации, аналогичной той, которая, как было показано, является эффективной в анализах на животных.

ii. Способы уменьшения иммунного ответа.

Предусмотрены различные способы уменьшения иммунного ответа у субъекта. Такие способы предусматривают введение субъекту, нуждающемуся в уменьшении иммунного ответа, терапевтически эффективного количества слитого белка IL-2/IL-2R α .

Большой интерес уделяется тому, как использовать подавляющую силу Treg для ингибирования нежелательных иммунных ответов. Данные, полученные на мыши и человеке, показали, что усиление

передачи сигнала IL-2R с помощью низкой дозы IL-2 селективно стимулирует Treg и усиливает иммунные толерогенные механизмы. Предусмотренные в настоящем документе слитые белки IL-2/IL-2R α представляют новую и улучшенную форму IL-2, которая эффективнее усиливает Treg. Таким образом, слитые белки IL-2/IL-2R α можно вводить пациентам с аутоиммунными заболеваниями, хронической реакцией "трансплантат против хозяина", реакциями отторжения трансплантата и другими состояниями, в которых целью является подавить аутореактивность.

Например, терапевтически эффективное количество слитого белка IL-2/IL-2R α , которое стимулирует иммунную толерантность, может найти применение, например, в лечении субъекта с аутоиммунным или воспалительным нарушением, включая в себя без ограничения отторжения трансплантатов и аллергии. Таким образом, согласно одному варианту осуществления предусмотрен способ лечения субъекта с аутоиммунным или воспалительным нарушением. Такой способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка IL-2/IL-2R α .

Неограничивающие примеры аутоиммунных нарушений, которые можно лечить или предотвращать, включают в себя сахарный диабет I типа, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, глютеную энтеропатию, системную красную волчанку, ювенильный идиопатический артрит, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит или системный склероз, реакцию "трансплантат против хозяина", вызванный HCV (вирус гепатита C) васкулит, гнездную алопецию или псориаз.

Дополнительные аутоиммунные заболевания включают в себя те, при которых, как показано, могут быть поражены Treg, и будут иметь благоприятный эффект от IL-2-зависимой стимуляции Treg. В этой связи, установили корреляцию однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в IL-2, IL-2R α или IL-2R13 в качестве фактора генетического риска сахарного диабета I типа, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, глютенной энтеропатии, системной красной волчанки, ювенильного идиопатического артрита, болезни Крона, неспецифического язвенного колита и системного склероза. Исследования позволяют предположить, что генетический риск связан с уменьшенным количеством и/или активностью Treg. Кроме того, было показано, что низкодозовая терапия IL-2 благоприятна для пациентов с хронической реакцией ТПХ и вызванным HCV васкулитом. Таким образом, таким популяциям пациентов также можно вводить терапевтически эффективное количество слитого белка IL-2/IL-2R α .

Согласно другим вариантам осуществления слитый белок IL-2/IL-2R α можно использовать в комбинации с терапевтическим средством для снижения иммунного ответа на указанное средство (т.е. белок). Например, слитый белок IL-2/IL-2R α можно использовать в комбинации с терапевтическим белком, который необходимо хронически вводить субъекту. Таким образом, согласно конкретному варианту осуществления способ предусматривает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства в комбинации со слитым белком IL-2/IL-2R α . Такие терапевтические средства включают в себя без ограничения цитокин, глюкокортикоид, антрациклин (например, доксорубицин или эпирубицин), фторхинолон (например, ципрофлоксацин), антифолат (например, метотрексат), анти-метаболит (например, фторурацил), ингибитор топоизомеразы (например, камптотецин, иринотекан или этопозид), алкилирующее средство (например, циклофосфамид, ифосфамид, митолактол или мелфалан), антиандроген (например, флутамид), антиэстроген (например, тамоксифен), соединение платины (например, цисплатин), алкалоид барвинка (например, винорелбин, винбластин или виндезин) или ингибитор митоза (например, паклитаксел или доцетаксел).

Более того, терапевтически эффективное количество слитого белка IL-2/IL-2R α можно дополнительно вводить в комбинированных видах терапий для увеличения Treg и толерантности. Такие комбинированные виды терапии могут содержать терапевтически эффективное количество слитого белка IL-2/IL-2R α в комбинации с анти-TNF α или другими средствами для ингибирования воспалительных ответов.

Терапевтически эффективное количество слитого белка IL-2/IL-2R α , применимое для уменьшения иммунного ответа, будет зависеть от подлежащего лечению субъекта, тяжести поражения и способа введения слитого белка IL-2/IL-2R α . Иллюстративные дозы включают в себя приблизительно 10^3 МЕ - приблизительно 10^6 МЕ активности IL-2 на организм взрослого человека или приблизительно 10^4 МЕ - приблизительно 10^6 МЕ активности IL-2 на организм взрослого человека. Иллюстративные дозы включают в себя приблизительно 10^3 - приблизительно 10^6 МЕ активности IL-2 на организм взрослого человека, приблизительно 10^3 - приблизительно 10^4 МЕ активности IL-2 на организм взрослого человека, приблизительно 10^4 - приблизительно 10^6 МЕ активности IL-2 на организм взрослого человека, приблизительно 10^4 - 10^5 МЕ активности IL-2 на организм взрослого человека, или приблизительно 10^5 - приблизительно 10^6 МЕ активности IL-2 на организм взрослого человека. В других случаях терапевтически эффективная доза слитого белка IL-2/IL-2R α составляет приблизительно 10^4 МЕ активности IL-2 $\pm$ 100-кратная, составляет приблизительно 10^4 МЕ активности IL-2 $\pm$ 10-кратная, приблизительно 10^4 МЕ активности IL-2 $\pm$ 2-кратная, приблизительно 10^4 МЕ активности IL-2 $\pm$ 20-кратная, приблизительно 10^4 МЕ активности IL-2 $\pm$ 30-кратная, приблизительно 10^4 МЕ активности IL-2 $\pm$ 40-кратная, приблизительно 10^4 МЕ активности IL-2 $\pm$ 50-кратная, приблизительно 10^4 МЕ активности IL-2 $\pm$ 60-кратная, приблизительно 10^4 МЕ

активности IL-2 $\pm$ 70-кратная, приблизительно 10^4 МЕ активности IL-2 $\pm$ 80-кратная или приблизительно 10^4 МЕ активности IL-2 $\pm$ 90-кратная. Согласно конкретному неограничивающему варианту осуществления слитый белок IL-2 человека вводят в указанной дозировке.

Согласно одному варианту осуществления стандартный образец для мышинового слитого белка IL-2 представляет собой мышинный IL-2 от eBiosciences (№ по кат.: 14-8021). Кратко, биоактивность мышинового IL-2 от eBioscience является следующей: значение ED50 указанного белка, измеряемое с помощью анализа клеточной пролиферации CTLL-2, меньше чем или равно 175 пг/мл. Это соответствует специфической активности, составляющей больше чем или равной $5,7 \times 10^6$ единиц/мг.

Согласно другому варианту осуществления стандартный образец для слитого белка IL-2 человека представляет собой лекарственное средство IL-2 человека, альдеслейкин (Пролейкин). Таким образом, раскрытые в настоящем документе слитые белки IL-2 напрямую сравнивают со слитым белком с лекарственным средством IL-2, которое используют в низкодозовой или высокодозовой терапии IL-2. В определении активности IL-2 для IL-2 мыши и человека используют одинаковый анализ, и их активность в единицах/мг является сходной. В отношении лекарственного средства IL-2 человека, т.е. альдеслейкина (Пролейкина), стандартная величина количества IL-2 представляет собой Международные Единицы (МЕ, или IU), которые технически не представляют собой фиксированное количество, а количество, которое производит фиксированный эффект в конкретном анализе биологической активности, т.е. анализе пролиферации CTLL. На практике производство IL-2 стандартизировано, и существует превращение массой лекарственного средства в международные единицы. Оно представляет собой следующее: 1,1 мг IL-2 = 18 млн. МЕ (сокращенно 18 ММЕ).

Кроме того, следует понимать, что соответствующие дозы функционального средства зависят от эффективности активного средства в отношении активности, подлежащей модулированию экспрессии или активности. Такие соответствующие дозы можно определить с использованием анализов, описанных в настоящем документе. Кроме того, следует понимать, что конкретный уровень дозы для любого конкретного субъекта-животного будет зависеть от разнообразных факторов, включая в себя активность используемого конкретного соединения, возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и диету субъекта, время введения, путь введения, скорость выведения и/или любую комбинацию лекарственных средств.

Если введение осуществляют с целью лечения, введение может происходить либо для профилактической, либо для терапевтической цели. Если предусмотрено профилактическое введение, вещество вводят до какого-либо симптома, профилактическое введение вещества служит для предотвращения или ослабления какого-либо возникающего впоследствии симптома. Если предусмотрено терапевтическое введение, вещество вводят при (или вскоре после) возникновения симптома. Терапевтическое введение вещества служит для ослабления любого существующего симптома.

Специалисту в настоящей области техники будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозировку, необходимую для эффективного лечения субъекта, включая в себя без ограничения тяжесть заболевания или нарушения, предыдущие виды лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие присутствующие заболевания. Более того, лечение субъекта с помощью терапевтически эффективного количества слитого белка IL-2/IL-2R α может предусматривать однократное лечение или предпочтительно может предусматривать серию введений. Также следует понимать, что эффективная дозировка слитого белка IL-2/IL-2R α , используемого для лечения, может увеличиваться или уменьшаться с течением курса конкретного лечения. Изменения в дозировке могут являться результатом и становиться очевидными из результатов диагностических анализов, описанных в настоящем документе.

Терапевтически эффективные количества слитого белка IL-2/IL-2R α можно определить с помощью исследований на животных. При использовании анализов на животных дозировку вводят для обеспечения целевой концентрации в ткани, аналогичной той, которая, как было показано, является эффективной в анализах на животных.

iii. Фармацевтическая композиция.

Различные слитые белки IL-2/IL-2R α , раскрытые в настоящем документе (которые также в настоящем документе называют "активные соединения") можно ввести в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции, как правило, содержат слитый белок и фармацевтически приемлемый носитель. Подразумевают, что используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любой и все растворители, дисперсионные среды, оболочки, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и подобное, совместимые с фармацевтическим введением. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в настоящей области техники. За исключением случаев, когда какая-либо общепринятая среда или средство являются несовместимыми с активным соединением, предусмотрено их применение в композициях. Дополнительные активные соединения также могут быть введены в композиции.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению составлен так, чтобы являться совместимой со своим путем введения. Примеры путей введения включают в себя парентеральный, на-

пример, внутривенный, интрадермальный, подкожный, пероральный (например, ингаляция), трансдермальный (местный) и трансмукозальный. Кроме того, может являться желательным введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции локально в область, нуждающуюся в лечении. Это можно достичь, например, путем локальной или региональной инфузии или перфузии во время операции, местного нанесения, инъекции, катетера, суппозитория или имплантата (например, имплантатов, образованных из пористых, непористых или гелеобразных материалов, включая в себя мембраны, такие как силиконовые мембраны или волокна), и подобное. Согласно другому варианту осуществления терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции доставляют в такой везикуле, как липосомы (см., например, Langer, *Science* 249:1527-33, 1990 и Treat et al., в *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez Berestein and Fidler (eds.), Liss, N.Y., pp. 353-65, 1989).

Согласно другому варианту осуществления терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции можно доставить в системе контролируемого высвобождения. Согласно одному примеру можно использовать насос (см., например, Langer, *Science* 249:1527-33, 1990; Sefton, *Crit. Rev. Biotmed. Eng.* 14:201-40, 1987; Buchwald et al., *Surgery* 88:507-16, 1980; Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574-79, 1989). Согласно другому примеру можно использовать полимерные материалы (см., например, Levy et al., *Science* 228:190-92, 1985; During et al., *Ann. Neurol.* 25:351-56, 1989; Howard et al., *J. Neurosurg.* 71:105-12, 1989). Также можно использовать другие системы контролируемого высвобождения, такие как обсуждаемые Langer (*Science* 249:1527-33, 1990).

Растворы или суспензии, используемые для парентерального, интрадермального или подкожного введения могут включать в себя следующие компоненты: такой стерильный разбавитель, как вода для инъекций, изотонический физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; такие антибактериальные средства, как бензиловый спирт или метилпарабены; такие антиоксиданты, как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; такие хелатирующие средства, как этилендиаминтетрауксусная кислота; такие буферы, как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстро́за. pH можно довести с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может содержаться в ампулах, одноразовых шприцах или содержащих многократные дозы флаконах, изготовленных из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекций, включают в себя стерильные водные растворы (если они растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. Для внутривенного введения подходящие носители включают в себя физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, *Stemophor* ETA(BASF; Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна являться стерильной и должна быть жидкой до той степени, чтобы существовала возможность легкого введения через шприц. Она должна быть стабильной при условиях производства и хранения, и необходимо предохранить ее от загрязняющего действия таких микроорганизмов, как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и подобное), и их подходящие смеси. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, с использованием оболочки, такой как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Профилактику действия микроорганизмов можно достичь с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тиомерсала и подобного. Во многих случаях предпочтительным является включение в композицию изотонических средств, например, Сахаров, многоатомных спиртов, таких как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированную абсорбцию инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию средства, которое замедляет абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы можно получать путем введения активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают с помощью введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты, из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и лиофилизацию, что дает на выходе порошок активного ингредиента вместе с любым дополнительным требуемым ингредиентом из его ранее стерилизованного фильтрованием раствора.

Для введения с помощью ингаляции соединения доставляют в форме аэрозольного спрея из контейнера под давлением или дозатора, который содержит подходящий пропеллент, например, такой газ, как диоксид углерода, или ингалятор.

Системное введение можно осуществить с помощью трансмукозальных или трансдермальных средств. Для трансмукозального или трансдермального введения пенетранты, соответствующие тому барьеру, который необходимо преодолеть, используют в составе. Такие пенетранты, как правило, извест-

ны в настоящей области техники, и включают в себя, например, для трансмукозального введения детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Трансмуккозальное введение можно осуществить посредством применения назальных спреев или суппозитория. Для трансдермального введения активные соединения вводят в состав мазей, бальзамов, гелей или кремов, как правило, известных в настоящей области техники. Соединения также можно получить в форме суппозитория (например, с такими общепринятыми основами для суппозитория, как масло какао и другие глицериды) или клизмы с удержанием для ректальной доставки.

Согласно одному варианту осуществления активные соединения получают вместе с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, такими как состав контролируемого высвобождения, включая в себя имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полиглицоловая кислота, коллаген, сложные полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких составов будут очевидны специалистам в настоящей области техники. Материалы также можно получить коммерчески от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомные суспензии (включая в себя липосомы, нацеленные на инфицированные клетки с помощью моноклональных антител к вирусным антигенам) также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получать согласно способам, известным специалистам в настоящей области техники, например, как описано в патенте США № 4522811.

Особенно предпочтительным является введение пероральных или парентеральных композиций в состав формы дозированных единиц для простоты введения и однородности дозировки. Форма дозированных единиц, используемая в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, приемлемым в качестве однократных дозровок для субъекта, подлежащего лечению с помощью каждой единицы, содержащей заданное количество активного соединения, рассчитанное так, чтобы производить требуемый терапевтический эффект, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Характеристики форм дозированных единиц согласно настоящему изобретению продиктованы и напрямую зависят от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, которого необходимо достичь, и ограничений, присущих области техники получения соединений, таких функциональное соединение для лечения индивидуумов.

Фармацевтические композиции могут содержаться в контейнере, упаковке или дозаторе вместе с инструкциями по введению.

iv. Наборы.

Используемый в настоящем документе "набор" содержит слитый белок IL-2/IL-2R α для применения в модулировании иммунного ответа, согласно проведенному в другом месте в настоящем документе описанию. Предусмотрено, что используемые в настоящем документе термины "набор" и "система" относятся по меньшей мере к одному или нескольким слитым белкам IL-2/IL-2R α , которые согласно конкретным вариантам осуществления находятся в комбинации с одним или несколькими типами элементов или компонентов (например, другие типы биохимических реагентов, контейнеры, упаковки, такие как упаковка, предусмотренная для коммерческого масштаба, инструкции по применению и подобное).

V. Идентичность последовательностей.

Как описано выше, предусмотрены активные варианты и фрагменты слитых белков IL-2/IL-2R α или полинуклеотида, кодирующего их, включая в себя различные компоненты слитого белка IL-2/IL-2R α . Такие компоненты включают в себя IL-2, внеклеточный домен IL-2R α , линкерные последовательности или последовательность Kozak. Активность, сохраняемую активным вариантом или фрагментом слитого белка или данного компонента слитого белка, обсуждают более подробно в другом месте в настоящем документе.

Такие варианты могут характеризоваться по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности относительно данного эталонного полипептида или полинуклеотида. Фрагмент может содержать по меньшей мере 10, 20, 30, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000 непрерывных нуклеотидов данной эталонной нуклеотидной последовательности или вплоть до полной длины данной нуклеотидной эталонной последовательности; или фрагмент может содержать по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 непрерывных аминокислот или вплоть до полной длины данной эталонной полипептидной последовательности.

Используемый в настоящем документе термин "идентичность последовательности" или "идентичность" в контексте двух полинуклеотидов или полипептидных последовательностей делает ссылку на остатки в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании для максимального соответствия в заданном окне сравнения. Если используют процентное отношение идентичности последовательностей со ссылкой на белки, принято, что положения остатков, которые не являются идентичными, часто отличаются на консервативные аминокислотные замены, при которых аминокислотные остатки заменены другими аминокислотными остатками со сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность), и, следовательно, они не изменяют функциональные свойства молекулы.

Если последовательности отличаются на консервативные замены, процентное отношение идентичности последовательности можно увеличить, чтобы скорректировать относительно консервативной природы замены. Считают, что последовательности, которые отличаются на такие консервативные замены, характеризуются "сходством последовательностей" или "сходством". Средства для осуществления такой корректировки хорошо известны специалистам в настоящей области техники. Как правило, они предусматривают присвоение балла консервативной замене как частичному несовпадению, а не полному, тем самым увеличивая процентное отношение идентичности последовательности. Таким образом, например, если идентичной аминокислоте присваивают балл 1, а неконсервативной замене присваивают балл 0, консервативной замене присваивают балл от 0 до 1. Баллы консервативных замен рассчитывают, например, как предусмотрено в программе PC/GENE (Intelligenetics, Маунтин-Вью, Калифорния).

Используемый в настоящем документе термин "процентное отношение идентичности последовательности" означает величину, определяемую путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в пределах окна сравнения, причем часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать вставки или делеции (т.е. пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит вставки или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процентное отношение рассчитывают путем определения числа положений, в которых идентичное нуклеиновокислотное основание или аминокислотный остаток присутствуют в обеих последовательностях для получения числа совпадающих положений, деля числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения, и умножая результат на 100 для получения процентного отношения идентичности последовательностей.

Если не указано иное, предусмотренные в настоящем документе значения идентичности/сходства последовательностей относятся к значению, полученному с использованием GAP версии 10 с использованием следующих параметров: % идентичности и % сходства для нуклеотидной последовательности с использованием штрафа за открытие делеции, составляющим 50, и штрафа за удлинение делеции, составляющего 3, и матрицы замен nwsgapdna.cmp; % идентичности и % сходства для аминокислотной последовательности с использованием штрафа за открытие делеции, составляющим 8, и штрафа за удлинение делеции, составляющего 2, и матрицы замен BLOSUM62; или любой эквивалентной ей программы. Под "эквивалентной программой" подразумевают любую программу сравнения последовательностей, которая для любых двух исследуемых последовательностей образует выравнивание, характеризующееся идентичными совпадениями нуклеотидов или аминокислотных остатков и идентичным процентным отношением идентичности последовательности по сравнению с соответствующим выравниванием, созданным с помощью GAP версии 10.

Используемые в настоящем документе формы единственного числа включают в себя ссылки на формы множественного числа, если только в контексте ясно не указано иное. Аналогично, подразумевают, что слово "или" включает в себя "и", если только в контексте ясно не указано иное. Кроме того, следует понимать, что все размеры оснований или размеры аминокислот и все значения молекулярного веса или молекулярной массы, приведенные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются приближенными и предусмотрены для описания.

Объект настоящего раскрытия дополнительно проиллюстрирован следующими неограничивающими примерами.

Экспериментальная часть

IL-2 представляет собой биологическое средство, которое использовали в попытках стимулировать иммунные ответы у пациентов со злокачественными опухолями и ВИЧ/СПИД. В последнее время пониженные дозы IL-2 использовали для селективной стимуляции толерантности для подавления нежелательных иммунных ответов, связанных с похожей на аутоиммунную атакой собственных тканей. Важно, что эти пониженные дозы IL-2 не продемонстрировали никаких признаков усиления или повторной активации аутореактивных Т-клеток. Тем не менее, IL-2 характеризуется важными недостатками в качестве терапевтического средства, включая в себя очень короткий период полужизни *in vivo*, который ограничивает его эффективность, и токсичность в высоких дозах. По этим причинам необходимы новые биологические средства на основе IL-2, характеризующиеся улучшенной фармакокинетикой и продолжительностью ответов для применения 1) в терапии на основе низких доз IL-2 для стимуляции регуляторных Т-клеток (Treg) и иммунной толерантности и 2) в адъювантной терапии с помощью повышенных доз для стимуляции иммунных ответов и памяти. Для достижения указанных целей разработали слияние белки IL-2/IL-2R α , причем указанные слияния разработали для увеличения доступности IL-2 путем увеличения стойкой стимуляции IL-2 несущих IL-2R лимфоцитов *in vivo*. Указанные слияния состоят из следующих сконструированных белков (фиг. 1): 1) лидерная последовательность IL-2, которая содержит оптимизированную последовательность Kozak для эффективной трансляции; 2) полноразмерная последовательность IL-2; 3) глициновая или глицин/сериновая линкерная последовательность изменяющейся длины; 4) кодирующая последовательность экспрессированного внеклеточного домена IL-2R α ; 5) глициновый спейсер из 2 аминокислот; 6) полигистидиновая область из шести аминокислот для очистки; и 7) два терминирующих кодона. Расчетные белковые последовательности из указанных кДНК мыши и человека

показаны для слитых белков IL-2/(GlySer)/IL-2R α на фиг. 2A и 2B, соответственно. Указанные кДНК клонировали экспрессионный вектор в pCneo и использовали для экспрессии указанных слитых белков в клетках COST. Анализ культуральных супернатантов показал, что каждый мышинный слитый белок проявлял биоактивность IL-2 *in vitro*, при этом оптимальная активность связана со слитым белком IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α (фиг. 3A). Соответственно, включение антитела к IL-2 в указанный биоанализ полностью ингибировало пролиферацию (фиг. 3B). Большие количества IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α и IL-2/(Gly₄Ser)₄/IL-2R α получали после экспрессии в клетках CHO и очищения с помощью аффинной хроматографии посредством связывания метки 6x His слитого белка с иммобилизованным никелем. Мышиный слитый белок IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α показал большую биоактивность IL-2, чем IL-2/(Gly₄Ser)₄/IL-2R α (фиг. 4A) даже несмотря на то, что оба слитых белка аналогично ингибировали связывание двух антител к IL-2R α (PC61 и 7D4) (фиг. 4B) с клетками, экспрессирующими IL-2R α , подтверждая большую активность IL-2 в ассоциации с первым слитым белком. Ингибирование связывания PC61 и 7D4 также указывает на то, что часть IL-2R α слитого белка сохраняла достаточную третичную структуру для связывания указанных антител. Тем не менее, указанные слитые белки не ингибировали связывание моноклонального антитела (3C7), направленного на сайт связывания IL-2 IL-2R α , с клетками, экспрессирующими IL-2R α . Этот результат показывает, что IL-2 в слитом белке IL-2/IL-2R α находится пространственно близко к сайту связывания IL-2R α (фиг. 5). Анализ вестерн-блоттинг указанных слитых белков показал, что IL-2/IL-2R α составлял 55-65 кДа, с несколько большей подвижностью при невосстанавливающем условии, и что он являлся приблизительно на 15 кДа больше, чем наблюдалось для растворимого IL-2R α (фиг. 6A). Соответственно, прямой анализ очищенного мышинного IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α с помощью SDS-PAGE соответствовал гетерогенному мономерному белку 55-65 кДа (фиг. 6B), что представляет собой расчетный размер для слитой молекулы IL-2 (15 кДа) и IL-2R α (40-50 кДа) (фиг. 6), где IL-2R α показывал гетерогенность размера вследствие обширного варибельного гликозилирования (Malek and Korty, J Immunol. 136:4092-4098, 1986). Немедленное следствие IL-2-зависимой передачи сигнала представляет собой фосфорилирование тирозина STATS (pSTATS). Лечение мышей с помощью мышинного IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α привело к обширной и селективной активации pSTATS в Treg через 30 мин после лечения (фиг. 7). Исследования зависимости ответа от дозы показали, что мышинный IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α влиял на число ключевых активностей Treg *in vivo* (фиг. 8). Указанные эффекты на Treg включали в себя следующее: увеличенная репрезентация (фиг. 8A) и количество (не показано) Treg в CD4⁺ Т-клеточном компартменте; положительная регуляция IL-2-зависимого CD25 (фиг. 8B); увеличенная пролиферация, что оценивали по экспрессии пролиферативного маркера Ki67 (фиг. 8C); и увеличенная фракция IL-2-зависимого терминально-дифференцированного подкласса Treg Klrp1⁺ (фиг. 8D). Указанные эффекты являлись наиболее выраженными для Treg в селезенке и воспаленной поджелудочной железе не страдающих ожирением диабетических мышей (NOD). 1000 единиц активности IL-2 согласно измерению в стандартном биоанализе CTLL IL-2, ассоциированной с IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α , показали сниженные, но легко измеряемые эффекты на Treg (фиг. 8). Мышей C57/BL6, получивших лечение с помощью IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α (2000 единиц активности IL-2) сравнивали с мышами, которые получали рекомбинантный IL-2 (25000 единиц) или агонистические комплексы IL-2/антитело к IL-2 (IL2/IC) (10000 единиц активности IL-2) (фиг. 9). IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α являлся намного более эффективным, чем рекомбинантный IL-2, и немного более эффективным, чем IL2/IC в индукции стойкого усиления Treg и связанных свойств (фиг. 9). Указанные увеличения толерогенных Treg происходили при 5- и 12,5-кратных пониженных уровнях активности IL-2 по сравнению с IL2/IC и рекомбинантным IL-2, соответственно. Рассматривая IL-2-зависимую активацию pSTAT5 в Treg напрямую *ex vivo* (фиг. 9), указанные данные позволяют предположить, что биологический период полужизни составлял приблизительно 72 ч для IL-2/IL-2R α . Преддиабетических мышей NOD подвергали короткому курсу лечения с помощью низких количеств IL-2/IL-2R α (фиг. 10). Отсрочку возникновения диабета наблюдали у тех мышей, которые получали лечение с помощью 800 Ед активности IL-2, связанной с IL-2/IL-2R α . В отношении иммунитета применение однократной высокой дозы IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α (12000 Ед активности IL-2) также впоследствии стимулировало CD8⁺ Т-клеточные ответы, особенно длительно живущие клетки памяти (фиг. 11). Вначале после иммунизации (28 день) CD44^{hi} CD62L^{lo} CD127^{hi} клетки эффекторной памяти (ЕМ) доминировали в пуле клеток памяти; тем не менее, с течением времени CD44^{hi} CD62L^{hi} CD127^{hi} клетки центральной памяти (СМ) увеличивались и клетки СМ доминировали в пуле памяти через 202 дней после иммунизации (фиг. 12). Таким образом, IL-2/(Gly₃Ser)₃/IL-2R α функционирует аналогичным рекомбинантному IL-2 образом со стимуляцией толерогенных и подавляющих иммунитет Treg и иммунитета посредством увеличения ответов эффекторных Т-клеток памяти, но он проявляет улучшенную фармакокинетику путем доставки таких ответов: 1) при пониженных эффективных уровнях активности IL-2; 2) с более стойкими биологическими ответами; и 3) сохраняя иерархию с Treg, чувствительными к более низким дозам, чем эффекторные Т-клетки памяти. Указанные данные поддерживают представление о том, что слитые белки IL-2/IL-2R α представляют улучшенный и новый класс лекарственных средств для доставки активности IL-2 для селективной стимуляции иммунной толерантности или иммунной памяти

при введении в правильной дозе и согласно правильной схеме.

Кроме того, получают слитые белки IL-2/IL-2R α , которые содержат IL-2 человека и IL-2R α человека (фиг. 1, фиг. 2B). Указанные кДНК экспрессировали в клетках СНО и секретированные слитые белки очищали на аффинной хроматографии с использованием никеля на основе метки 6x-His. Слитые белки варьировали по длине глицин/сериновых линкеров аналогично тем, которые использовали для мышинных IL-2/IL-2R α . Все 4 полученных слитых белка IL-2/IL-2R α человека проявляли биоактивность IL-2 с использованием анализа мышинного CTLL (фиг. 13A). Анализ вестерн-блоттинг подтвердил, что IL-2/IL-2R α человека также показал гетерологичную полосу между 55-60 кДа (фиг. 13B), что согласуется с высокогликозилированными молекулами, предполагаемыми для IL-2, связанного с IL-2R α . Слитые белки IL-2/IL-2R α с (G₃S)₃ и особенно (G₄S)₄ линкерами могут характеризоваться большей активностью, поскольку наблюдалось меньше слитого белка, даже если эквивалентное количество активности IL-2 загружали на каждую дорожку (фиг. 13B). Способность слитого белка ингибировать связывание моноклональных антител к IL-2R α , M-A257 и BC96, с клетками, несущими IL-2R α человека, указывает на то, что IL-2R α слитого белка сохранял достаточную третичную структуру для связывания с указанными антителами (фиг. 14). Тем не менее, указанные слитые белки лишь частично ингибировали связывание моноклонального антитела (BC96), направленного на сайт связывания IL-2 IL-2R α , указывая на то, что IL-2 в слитом белке IL-2/IL-2R α расположен пространственно близко к сайту связывания IL-2R α . Более того, авторы настоящего изобретения оценили специфическую активность слитых белков IL-2/IL-2R α мыши и человека, содержащих линкер (G₃S)₃, составляющую 80 и 2000 пМ, соответственно, для 1 Ед/мл биоактивности IL-2. Указанные значения намного превышают активность рекомбинантного IL-2, которая составляет 10 пМ для 1 Ед/мл. Различия в активностях между IL-2/IL-2R α человека и мыши по меньшей мере частично объясняют относительной неэффективностью слитого белка человека в поддержании пролиферации мышинных клеток CTLL в биоанализе по сравнению с мышинными слитыми белками или рекомбинантным IL-2 мыши и человека (не показано). Указанные относительно низкие специфические активности и результаты блокирования антителом (фиг. 5 и 12) указывают на возможность существования специфического внутримолекулярного взаимодействия между IL-2 и IL-2R α в пределах слитого белка, которое ограничивает количество IL-2 в слитом белке для стимуляции клеток, несущих IL-2R. Для прямого анализа этой точки зрения два остатка аргинина в сайте связывания IL-2 IL-2R α человека (см. Robb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5654-5658, 1988) подвергали мутации до треонина и серина. Авторы настоящего изобретения обнаружили намного большую биоактивность, связанную с указанными мутантными слитыми белками IL-2R (фиг. 15); оценили, что специфическая активность мутированных слитых белков IL-2/IL-2R α составляла приблизительно 5 пМ для 1 Ед/мл активности IL-2, значения, очень сходного с рекомбинантным IL-2. Таким образом, эти данные указывают на то, что IL-2/IL-2R α человека является биологически активным, и полагают, что одним специфическим механизмом действия, который обуславливает пролонгированную активность IL-2 в указанных слитых белках, является конкурентное взаимодействие между фрагментом IL-2 с областью связывания IL-2 IL-2R α слитого белка и с клетками, которые экспрессируют IL-2R.

Таблица 1

Краткое раскрытие последовательностей

SEQ ID NO	AA/NT	Источник	Описание	
1	AA	Человек	Непроцессированный IL-2-	Регистрационный номер GenBank AAB46883 IL-2 myrmqlisci alsalvtns aptssstkt qlqlehlld lqmlnginn yknpktrmltkfymppka telkhlqcle eelkpleevl nlaqsknfhl rprdlisnin vivielkgsettfmceyade tatvefinr wtfqsis tit
2	AA	Человек	IL-2 – зрелая форма	GenBank AAB46883 с удаленными первыми 20 aa aptssstkt qlqlehlld lqmlnginn yknpktrmltkfymppka telkhlqcle eelkpleevl nlaqsknfhl rprdlisnin vivielkgsettfmceyade tatvefinr wtfqsis tit
3	AA	Мышь	Непроцессированный IL-2	Регистрационный номер P04351 MYSMQLASCV TLTLVLLVNS APTSSSTSSS TAEAQQQQQQ QQQQQQHLEQ LLMDLQELLS RMENYRNKL PRMLTKFYLL PKQATELKDQL QCLEDELGPL RHVLDLTQSK SFQLEDAENF ISNIRVTVVK LKGSNTFEC QFDDSATVV DFLRRWIAFC QSIISTSPQ
4	AA	Мышь	Зрелая форма IL-2	Зрелая форма регистрационного номера P04351 APTSSSTSSS TAEAQQQQQQ QQQQQQHLEQ LLMDLQELLS RMENYRNKL PRMLTKFYLL PKQATELKDQL QCLEDELGPL RHVLDLTQSK SFQLEDAENF ISNIRVTVVK LKGSNTFEC QFDDSATVV DFLRRWIAFC QSIISTSPQ
5	AA	Человек	Непроцессированная форма IL-2R α	Регистрационный номер Genebank NP_000408 1 mdsyllmwgl ltfmvpqgc aelcddppe iphatfkama ykegtmlnce ckrgfrrikslymictgn sshsswdnqc qctssatnt tkqvtppqee qkerkttemq spmqpvdqaslgphcreppp weneateriy hfvgqmvyv qcvqgyralh rgpaesvckm thgktrwtqpqlctgemet sqfpgeekpq aspegrpese tscivtttdf qiqtemaatm etsiftteyqvavagcvfll isvllsglt wqrrqrksrr ti
6	AA	Человек	Зрелая форма IL-2R α	Первые 1-21 AA, удаленные из NP_000408 1 elcddppe iphatfkama ykegtmlnce ckrgfrrikslymictgn sshsswdnqc qctssatnt tkqvtppqee qkerkttemq spmqpvdqas lgphcreppp weneateriy hfvgqmvyv qcvqgyralh rgpaesvckm thgktrwtqpqlctgemet sqfpgeekpq aspegrpese tscivtttdf qiqtemaatm etsiftteyqvavagcvfll isvllsglt wqrrqrksrr ti
7	AA	Человек	Зрелая форма внеклеточного домсена IL-2R α	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGN SSHSSWDNQCQCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVD QASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYRALHRGPA ESVCKMTHGKTRWTQPQLCTGEMETSQFPGEKQPQASPEGRPESETS CLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
8	AA	Мышь	Непроцессированная форма IL-2R α	Регистрационный номер NP_032393 3 mepriimigf isitvpscr aelcldppe vnatfkals ykngtlince ckrgfrrikelvymrcigns wssncqctsn shdksrkvt aqlehqkeq tttdmqkptq smhgentghcrepppwkhe dskriyhve gqsvhyecip gykalgrgpa isickmckgk tgwtqpqlctvderehrfll aseesqgsrn sspesetscp ittdfpqpt ettamtetfv ltmeykvavascifllisllsgltwqhr wrksrrti
9	AA	Мышь	Зрелая форма IL-2R α	aa 1-21, удаленные из регистрационного номера NP_032393 3 elcldppe vnatfkals ykngtlince ckrgfrrikelvymrcigns wssncqctsn shdksrkvt aqlehqkeq tttdmqkptq smhgentgh crepppwkhe dskriyhve gqsvhyecip gykalgrgpa isickmckgk tgwtqpqlct vderehrfll aseesqgsrn spsesetscp ittdfpqpt ettamtetfv ltmeykvava scifllisllsgltwqhr wrksrrti

10	AA	Мышь	Зрелая форма внклеточного домена IL-2R α	elclcydppe vpmatfkals ykngtlnce ckrgrfrlike lvyrmclgns wssncqctsn shdksrkqvt aqlqhkeqeq ttttdmqkptq smhqneltgh creppppwkhe dskriyhfe gqsvhyecip gykalqrgpa isickmckgk tgwtpqqltc vderehhrfl aseesqgsrn sspesetscp itttfdpqpt ettamtetfv ltmeyk
11	AA		линкер (Gly3Ser)4	GGGSGGGSGGGSGGGSGG
12	AA		линкер (Gly3Ser)2	GGGSGGGSGG
13	AA		линкер (Gly3Ser)3	GGGSGGGSGGGSGG
14	AA		(Gly3Ser)5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
15	AA		линкер Gly3	GGG
16	AA	Мышь	Зрелая форма IL-2 (Gly4Ser)4- внклеточный домен IL-2R α	APTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQHLEQLMDLQELLSRMENYRN LKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAE NFISNIRVTVVKLKGSNDTEFCQFDDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSELCLYDPPPEVPNATFKALSYKNGTILNLC ECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQK EQQTITDDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSV HYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTPQLTCVDEREHHRFLASE ESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFVLTMEYK
17	AA	Мышь	Непроцессированная форма IL-2 (Gly4Ser)4- внклеточный домен IL-2R α	MDSMQLASCVTLLTVLLVNSAPTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQH LEQLMDLQELLSRMENYRNKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNDTEFCQFDDESA TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGGSGGGSGGGSGGGSELCLYDPP PEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCT TSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTITDDMQKPTQSMHQENLTGHCRE PPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTG WTQPQLTCVDEREH HRFLASE ESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTET TAMTETFVLTMEYK
18	AA	Мышь	Зрелая форма IL-2 (Gly4Ser)5- внклеточный домен IL-2 R α	APTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQHLEQLMDLQELLSRMENYRN LKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAE NFISNIRVTVVKLKGSNDTEFCQFDDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSELCLYDPPPEVPNATFKALSYKN GTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLE HQKEQQTITDDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPPWKHEDSKRIYHF VEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTPQLTCVDEREH HRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFVLTMEYK
19	AA	Мышь	Непроцессированная форма IL-2 (Gly4Ser)5- внклеточный домен IL-2R α	MDSMQLASCVTLLTVLLVNSAPTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQH LEQLMDLQELLSRMENYRNKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNDTEFCQFDDESA TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSE LCLYDPPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSW SNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLE HQKEQQTITDDMQKPTQSMHQENLT GHCREPPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKC GKTGWTPQLTCVDEREHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQ PTETTAMTETFVLTMEYK
20	AA	Мышь	Зрелая форма IL-2 (Gly3Ser)4- внклеточный домен IL-2R α	APTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQHLEQLMDLQELLSRMENYRN LKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAE NFISNIRVIVVVKLGSDNTEFCQFDDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ GGGSGGGSGGGSGGGSELCLYDPPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRG FRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTIT TDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIP GYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTPQLTCVDEREHHRFLASEESQGS RNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFVLTMEYK
21	AA	Мышь	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)4- внклеточный домен IL-2R α	MDSMQLASCVTLLTVLLVNSAPTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQH LEQLMDLQELLSRMENYRNKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNDTEFCQFDDESA TVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQGGGGSGGGSGGGSGGGSELCLYDPPPEVP NATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSSNCQCTSN HDKSRKQVTAQLEHQKEQQTITDDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPPW KHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTPQ

				QLTCVDREHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPTITTDFFQPPTETTAMTE TFVLTMEYK
22	AA	Человек	Зрелая форма IL-2 (Gly4Ser)4- внеклеточный домен IL-2R α	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTF MCEYADETATIVFELNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGG SELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTG NSSHSSWDNQCQCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPV DQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYRALHRGP AESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQASPEGRPESET SCLVTTDFQ1QTEMAATMETSIFTTEYQ
23	AA	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly4Ser)4- внеклеточный домен IL-2R α	MDRMQLLSICIALSLVNTSAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVFELNRWITFCQSIISTLT GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM NCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSHSSWDNQCQCTSSATRNNTTKQVT PQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFV VGQMVVYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEME TSQFPGEKPKQASPEGRPESETSCLVTTDFQ1QTEMAATMETSIFTTEY Q
24	AA	Человек	Зрелая форма IL-2 (Gly3Ser)4- внеклеточный домен IL-2R α	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTF MCEYADETATIVFELNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSELCD DDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSHSS SWDNQCQCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQAS LPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYRALHRGPAESVC KMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQASPEGRPESETSCLVTT DFQ1QTEMAATMETSIFTTEYQ
25	AA	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)4- внеклеточный домен IL-2R α	MDRMQLLSICIALSLVNTSAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVFELNRWITFCQSIISTLT GGGGSGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECK RGFRRIKSGSLYMLCTGNSHSSWDNQCQCTSSATRNNTTKQVTPQPEE QKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQ MVVYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQF PGEKPKQASPEGRPESETSCLVTTDFQ1QTEMAATMETSIFTTEYQ
26	AA	Человек	Зрелая форма IL-2 (Gly3Ser)3- внеклеточный домен IL-2R α	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTF MCEYADETATIVFELNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSELCDDDPP EIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSHSSWD NQCQCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGH CREPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYRALHRGPAESVCKMT HGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQASPEGRPESETSCLVTTDF Q1QTEMAATMETSIFTTEYQ
27	AA	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)3- внеклеточный домен IL-2R α	MDRMQLLSICIALSLVNTSAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVFELNRWITFCQSIISTLT GGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFR IKSGSLYMLCTGNSHSSWDNQCQCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKE RKT TEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQ VQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPK QASPEGRPESETSCLVTTDFQ1QTEMAATMETSIFTTEYQ
28	NT	Человек	Лидерная оптимизированная последовательность Kozak IL-2	gccaccATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGATTGCACTAAGTCTTG CACTTGTACAAACAGT
29	NT	Мышь	Непроцессированная форма IL-2 (Gly4Ser)4- внеклеточный домен IL-2R α	ATGGACAGCATGCAGCTCGCATCTGTGTACATTGACACTGTGTCTC CTTGTCAACAGCGCACCCACTTCAAGCTCTACTTCAAGCTCTACAGCG GAAGCACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCTGG AG CAGCTGTTGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAGCAGGATGGAGAA TTACAGGAACCTGAAACTCCCCAGGATGCTCACCTTCAAATTTTACTT GCCAAGCAGGCCACAGAATTGAAAGATCTTCAGTGCCTAGAAAGATG AAGCTTGACCTCTGCGGCATGTTCTGGATTGACTCAAAGCAAAGAC

045313

				TTTCAATTGGAAGATGCTGAGAATTTTCATCAGCAATATCAGAGTAACT GTTGTAATAACTAAAGGGCTCTGCACAACACTTTGAGTGCCAATTCCA TGATGAGTCAGCAACTGTGGTGAACTTTCTGAGGAGATGGATAGCCT TCTGTCAAAGCATCATCTCAACAAGCCCTCAAGgttgagggttgatctgggtg agggtggatcagggtgggtggatccgggtgggtggatctGAACGTGTGCTGATG ACCCACCCGAGGTCGCCAATGCCAATTTCAAAGCCCTCTCTCAACAAG ACGGCACCATCTTAACTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGAAGACTA AAGGAATTTGGTCTATATGCGTTGCTTAGGAAACTCTGGAGCAGCAA CTGCCAGTGCACCAAGCACTCCCATGACAAATCGAGAAGCAAGTTA CAGCTCACTTGAACACCAAGAGCAACAACACCAACAGACATG CAGAAG CCAACACAGTCTATGCACCAAG AG AACCTTACAG GTCACTG CAG GGAGCACCCTCTTGGAACACATGAAGATTCGAAGAGAATCTATC ATTTCTGTGGAAGGACAGAGTGTTCATCAGAGTGTATCCGGGATAC AAGGCTCACAGAGAGGTCCTGTATTAGCATCTCGAAGATGAAGTG TGGGAAATCGGGGTGGACTCAGCCCGAGTCCACATGTGTAGATGA AGAGAACCAACCAAGTATTCGGCTAGTGAGGAATCTCAAGGAAGCA GAAATTTCTTCCCGAGAGTGAGACTTCTGCCCATACCAACCAAG ACTTCCCAACCCACAGAAACAACATGCAATTGACGGAGACATTTGTG CTCACAATGGAGTATAAGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATA A
30	NT	Мышь	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser) ⁴ - включительный домен IL-2 R α	ATGGACAGCATGCAGCTCGCATCTGTGTACATTTGACACTTTGTGCTC CTTGTCAACAGCGCACCCACTTCAAGCTCTACTTCAAGCTCTACAGCG GAAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCTGG AGCAGCTGTGATGGACTACAGGAGTCTCTGAGCAGATGGAGAA TTACAGGAACCTGAAACTCCCCAGGATGCTCACCTTCAAATTTTACTT GCCCAAGCAGCCACAGAATTGAAAGATCTTCAGTGCCTGAAGAATG AACTTGGACTCTCGCGCATGTTCTGGATTTGACTCAAAGCAAAAGC TTTCAATTGGAAGATGCTGAGAATTTTCATCAGCAATATCAGAGTAACT GTTGTAATAACTAAAGGGCTCTGCACAACACTTTGAGTGCCAATTCCA TGATGAGTCAGCAACTGTGGTGAACTTTCTGAGGAGATGGATAGCCT TCTGTCAAAGCATCATCTCAACAAGCCCTCAAGgttgagggttgatctgggtg tcagggtggagggttgagggttctGAACGTGTGTCTGTATGACCAACCCGAG GTCCCCATGTCCCAATTTCAAAGCCCTCTCTCAAGAAGACGGCACCATC CTAAACTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGAAGACTAAAGGAATTTGGT CTATATGCGTTGCTTAGGAAACTCTCGAGCAGCAACTGCCAGTGCA CCAGCAACTCCCATGACAAATCGAGAAGCAAGTTACAGCTCAACT GAAACCCAGGAAGAGCAACAACCAACAAGACATGTCAGAAGCCAA CACAGTCTATGCACCAAGAGAACTTACAGGTCACTGCGAGGAGCCA CCTCTTGGAAACATGAAGATTCGAAGAAATCTATCACTTTCGTGGAA GGACAGAGTGTTCATCAGAGTGATTTCCGGGATACAAGGCTCTACA GAGAGGTCCTGCTATTAGCATCTGCAAGATGAAGTGTGGGAAACAG GGGTGGACTCAGCCCAAGCTCATATGTGTAGATGAAAGAGAACACC ACCGATTTCTGGCTAGTGAAGAAATCTCAAGGAAGCAAGAAATTTCTCT CCCAGAGTGAGACTTCTGCCCATACCAACCAACAGACTTCCACAA CCCAAGAAACAACATGCAATTGACGGAGACATTTGTCTCACAATGGAG GTATAAGGTTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA

[illegible]

33	NT	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3 Ser)4-внеклеточный домен IL-2R α	ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAGAAAAACAGCTACAACCTGGAGCATTACTGCTGGATTACAGATGATTTGAATGGAAATAAATAATTACAAGAATCCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTAAAGTTTACATGCCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAG AACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACATAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA TGCTGATGAGACAGCAACCATTTGAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTggtaggaggttctggtaggaggttcaggtaggaggttgggtaggaggttctGAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCACACGCCACATTCAAAGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCA TGTGAACTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGCAAGATAAAAGCGGGTCACTCTATATGCTCTGTACAGGAACTCTAGCACTCGTCTCTGGGA CAACCAATGTCAATGCACAAGCTCTGCCACTCGGAACACAACGAAAC AAGTGACACCTCAACCTGAAGAACAGAAAGAAAGGAAACACAGAAATGCAAACTCAATGCAGCCAGTGGACCAAGCGAGCCTCCAGGTC ACTGCAGGGAACCTCCACCATGGGAAATGAAGCCACAGAGAGAATTTATCATTTCTGGTGGGGCAGATGGTTATTATCATGCGTCCAGG GATACAGGGCTCTACACAGAGGTCCTGCTGAGAGCGTCTGCAAAATG ACCCACGGGAAGACAAGGTGGACCCAGCCAGCTCATATGCACAG GTGAAATGGAGACCAAGTCAGTTCCAGGTGAAGAGAAAGCCTCAGGC AAGCCCCGAAGGCCGCTCTGAGAGTGAGACTTCTGCTCTGTCAACA CAACAGATTTCAAATACAGACAGAAATGGCTGCAACCATGGAGACG TCCATATTACAACAGAGTACCAGGTGGACATCACCATCACCATCAC TAATAA
34	NT	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)3-внеклеточный домен IL-2R α	ATGGACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAGAAAAACAGCTACAACCTGGAGCATTACTGCTGGATTACAGATGATTTGAATGGAAATAAATAATTACAAGAATCCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTAAAGTTTACATGCCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACATAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATA TGCTGATGAGACAGCAACCATTTGAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTggtaggaggttctggtaggaggttcaggtaggaggttggGAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCACAC CGCCACATTCAAAGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCATGTTGAAC TGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGCAAGATAAAAGCGGGTCACTCTAT ATGCTCTGTACAGGAACTCTAGCCACTCGTCTCTGGGACAACCAATG TCAATGCACAAGCTCTGCCACTCGGAACACAACGAAACAAAGTGACAC CTCACCTGAAGAACAGAAAGAAAGGAAAAACACAGAAATGCAAG TCCAATGCAGCCAGTGGACCAAGCGAGCCTCCAGGTCACTGCAGGG AACCTCCACCATGGGAAATGAAGCCACAGAGAGAAATTTATCATTTCT GTGGTGGGGCAGATGGTTATTATCATGTCGCTCCAGGGATACAGGG CTCTACACAGAGGTCCTGCTGAGAGCGTCTGCAAAATGACCCACGGG AAGACAAGGTGGACCCAGCCAGCTCATATGCACAGGTGAAATGG AGACCAGTCAGTTCCAGGTGAAGAGAAAGCCTCAGGCAAGCCCCGA AGGCCGCTCTGAGAGTGAGACTTCTGCTCTGTCAACAACAGAGATT TCAAATACAGACAGAAATGGCTGCAACCATGGAGACGTCATATTT ACAACAGAGTACCAGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA
35	NT		Консенсус Kozak	(gcc)gccRccAUGG
36	AA	Мышь	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)3-внеклеточный домен IL-2R α	MYSMQLASCVTLTLVLVNSAPTSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLMTFKFYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVVKLGSDNTFCQFDDESA TVVDLRRWIAFCQSIISTSPQGGGSGGGSGGGSELCLYDPPEVPNATFK ALSYKNGTILNCECKRGRFRRLKELVYMRCLGNSWSNQCQTSNSHDKSR KQVTAQLQEHQKEQQTTTDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPPWKHEDS KRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISIC27KMKCGKTGWTPQLTIC VDEREHHRLASEESQGSRRNSPESETSCPIITTTDFPQPTETAMTETFVL TMEYK

37	AA	Мышь	Зрелая форма IL-2 (Gly3Ser)3-внешлостный домен IL-2Rα	MDMSQLASCVTLTLVLVNSAPTSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQQQ LEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRMLFKFYLPKQATLEKDLQCLEDEL GPLRHVLDTQKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLGSDNTFECQFDDESA TVVDFLRRWIAQCSQIISTSPQGGGSGGGSGGGSECLYDPPEVPNATFK ALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRCLGNSWSNCCQTSNHSOKSR KQVTAQLEHQKEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCREPPPWKHEDS KRIVHFVGEQSVHYECIPGYKALQRGPAISCKMKCGKTGWTPQLTCV DEREHNHRLFAEESQGSRNSSPESETSCPIITDFDPQTETTAMTETVLT MEYK
38	AA	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly4Ser)5-внешлостный домен IL-2Rα	MDRMQLSCIALSLALVTNSAPTSSTSKTKQLQLEHLHLLDLQMLNGINN YKNPKLRMTLTKFYMPKPKATELKHQLQCLEELKPLEVLNLAQSKNFHL RPRLDISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVELNLRWITFCQSIISTL GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSELCDPDPPEIPHATFKAMAYK EGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCCQTSSTRNT TKVQTPPEEQKERKTTQMSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAETE RIYHFVVGQMVVYQCVQGYRALH RGAPEVCKMTH GKTRWTPQLICTGE METSQFPGEKQPAQSPGPRPESETSCLVITDFDQIQTEMAATMETS IFTTEYQ
39	AA	Человек	Зрелая форма IL-2 (Gly4Ser)5-внешлостный домен IL-2Rα человека	APTSSSTKTKQLQLEHLHLLDLQMLNGINNYKNPKLRMTLTKFYMPKKA TELKHQLQCLEELKPLEVLNLAQSKNFHLRPRLDISNINIVLELKGSETTF MCEYADETATIVELNLRWITFCQSIISTLGGGSGGGSGGGSGGGSELCD SGGGSGGGSELCDPDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGSL YMLCTGNSSHSSWDNQCCQTSSTRNTTKVQTPPEEQKERKTTQMSP MQPVDQASLPGHCREPPPWENEAETERIYHFVVGQMVVYQCVQGYR ALHGRGAPEVCKMTHGKTRWTPQLICTGEMETSQFPGEKQPAQSPG RPESETSCLVITDFDQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
40	AA		Линктерная последовательность (Gly4Ser)4	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
41	AA		Линктерная последовательность (Gly4Ser)5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
42	NT	Мышь	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)3-внешлостный домен IL-2Rα	ATGGACAGCATGCAGCTCGCATCTGTGTACAACTTGACACTTGTGCTC CTTGTCAACAGCGCACCCACTTCAAGCTCTACTTCAAGCTCTACAGCG GAGGACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCTGG ACAGCAGCTGTTGATGGACATACAGGAGCTCTCTGAGCAGGATGGAGAA ATTACAGGAACCTGAACATCCCCAGGATGCTCACTTCAAAITTTACTT GCCCAAGCAGGCCACAGAATTGAAGATCTTCACTGCTGCTAAGAAGATG AATTGCTGACCTCTCGCGCATGTTCTGGATTTGACTCAAGACAAAAGC TTTCAATTGGAAAGATGCTGAGAATTTCAATCAGCAATATCAGAGTAAC GTTGTAAATCAAGAGGCTCTGACAACACTTTGAGTGCCAATTCGA TGATAGCTCAGCAACTGTGGTGACTTCTGAGGAGATGGATAGCTCT TCTGTCAAGAGCATCATCTCAACAAGCCCTCAAGGTGAGGTTCTGGT GGAGGTTTCAGGTGGAGGTTGCGAACTGTGTCTGTATGACCAACCGG A GGTCCCCAATGCCAATTCAGAGCCCTCTCTCAAGAAGCGGCACCATT CTCTAACTGTGAATGCAAGAGAGGTTTCCGAAGACTAAAGGAATTTGG TCTATATGCTTGTCTAGGAACCTCTGGAGCAGCAACTGCCAGTGC ACCAGCAACTTCCATGACAAATCGAGAAAGCAAGTTACAGCTCAACT TGAACAGCAGAAAGAGCAACAACCAACAGACATGCAAGAGCCA ACACAGTCTATGACCAAGAGAACCTTACAGGTCCTCACTGAGGAGGCC ACCTCTTGGAAAGATGAAGATTCGAAGAATCTATCACTTCTGTGGA AGGACAGAGTGTTCACTACGAGTGATTCCGGGATACAAGGCTCTAC AGAGAGGCTCTGCTATTAGCATCTGCAAGATGAAGTGTGGGAAAAAC GGGGGGGACTCAGCCCCAGCTCACATGTGTAGATGAAGAAGAACAC CACCGATTCTTGGCTAGTGAGGAATCTCAAGGAAGCAAGAAITTTCT TCCCGAGAGTGAGACTTCTGCCCCATAACCAACACAGACTTCCACA ACCCAGAAAGAACTGCAATGACGGAGACATTTGTCTCACAATGG AGTATAAGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA

43	AA	Человек	Зрелая форма IL-2 (Gly3Ser)2-внеклеточный домен IL-2R α	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISININIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSGGGSELCDDDPPEIPHA TFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGLYMLCTGNSSHSSWDNQCC TSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPP WENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTR WTQPLQICTGEMETSQFPGEKPQASPEGRPESETSLVTTTDFQIQTE MAATMETSIFTTEYQ
44	AA	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)2-внеклеточный домен IL-2R α	MDRMQLISCIALSLVNTSAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVNLAQSKNFHL RPRDLISININIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT GGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGS LYMLCTGNSSHSSWDNQCCQCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTE MQSPMQPVDQASLPGHCREPPP WENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGY RALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPLQICTGEMETSQFPGEKPQASPE GRPESETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
45	AA	Человек	Зрелая форма IL-2 (Gly3)-внеклеточный домен IL-2R α	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISININIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGSELCDDDPPEIPHATFK MAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCCQCTSSA TRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPP WEN EATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPL QICTGEMETSQFPGEKPQASPEGRPESETSLVTTTDFQIQTEMAAT METSIFTTEYQ
46	AA	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3)-внеклеточный домен IL-2R α	MDRMQLISCIALSLVNTSAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKA TELKHLQCLEELKPLEEVNLAQSKNFHL RPRDLISININIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT GGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGSLYMLCT GNSSHSSWDNQCCQCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQ PVDQASLPGHCREPPP WENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYRALHR
				GPAESVCKMTHGKTRWTQPLQICTGEMETSQFPGEKPQASPEGRPE SETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
47	NT	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)2-внеклеточный домен IL-2R α	ATGGACAGGATGCAACTCCTGCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTT GTCACAAACAGTGCACTACTTCAAGTTCTACAAAGAAACACAGCT ACAACCTGGAGCATTACTGCTGGATTACAGATGATTTGAATGGAAT TAATAATTACAAGAAATCCCAACTCACCAGGATGCTCATTAAAGTT TTACATGCCCAAGAGGCCACAGAACTGAAACATCTCAGTGCTAG AAGAAGAAGCTCAAACTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGC AAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAACCTAAAGGGATCTGAAACAACATTATGTGTGAATA TGCTGATGAGACAGCAACCATTTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTA CCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTgggtggaggttctgggtggaggt tcaGAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCACACGCAACATT AAAGCCATGGCCTACAAGGAAGGAACCATGTTGAACTGTGAATGCA AGAGAGGTTTCCGAGAATAAAAGCGGGTCACTATATGCTGCTGT ACAGGAACTCTAGCCACTGCTCTGGGACAACCAATGTCAATGCAC AAGCTCTGCCACTCGGAACACAACGAACAAGTGACACCTCAACCTG AAGAACAGAAAGAAAGGAAACACAGAAATGCAAAAGTCCAATGCA GCCAGTGGACCAAGCGAGCCTTCCAGGTCACTGCAGGGAACCTCCAC CATGGGAAATGAAGCCACAGAGAGAATTTATCATTTCTGGTGGG GCAGATGGTTTATTACAGTGCCTCCAGGGATACAGGGCTCTACACA GAGGTCTGCTGAGAGCGTCTGCAAAATGACCCACGGGAAGACAAG GTGGACCCAGCCAGCTCATATGCACAGGTGAAATGGAGACAGTC AGTTTCCAGGTGAAGAGAAGCCTCAGGCAAGCCCGAAGGCCGTCC TGAGAGTGAGACTTCTGCTCTGTCACAAACAGATTTTCAAATACA GACAGAAATGGCTGCAACCATGGAGACGTCCATATTTACAACAGAGT ACCAGGGTGGACATCACCATCACCATCAATAA

[illegible]

54	AA	Мышь	Непроцессированная форма IL-2 (Gly4Ser)4-внеклеточный домен IL-2R α + глициновый спейсер и полигистидиновая область	MDSMQLASCVTILTVLLVNSAPTSSSTSSSTAQAQQQQQQQQQQH LEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLMTFKFYLPKQATELKDLCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLGSDNTFECQFDDESA TVVDFLRWWIAFCQSIISTSPQGGGSGGGGSGGGGSGGGGSELCLYDP PEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRLGNSWSSNCQC TSNSHDKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCRE PPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTG WTQPQLTCVDEREHHFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTET TAMTETFVLTMKYGGHHHHHH
55	AA	Мышь	Непроцессированная форма IL-2 (Gly4Ser)5-внеклеточный домен IL-2R α + глициновый спейсер и полигистидиновая область	MDSMQLASCVTILTVLLVNSAPTSSSTSSSTAQAQQQQQQQQQQH LEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLMTFKFYLPKQATELKDLCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLGSDNTFECQFDDESA TVVDFLRWWIAFCQSIISTSPQGGGSGGGGSGGGGSGGGGSELCLYDP PEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRLGNSWSSNCQC TSNSHDKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCRE PPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTG WTQPQLTCVDEREHHFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTET TAMTETFVLTMKYGGHHHHHH
56	AA	Мышь	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)4-внеклеточный домен IL-2R α + глициновый спейсер и полигистидиновая область	MDSMQLASCVTILTVLLVNSAPTSSSTSSSTAQAQQQQQQQQQQH LEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLMTFKFYLPKQATELKDLCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLGSDNTFECQFDDESA TVVDFLRWWIAFCQSIISTSPQGGGSGGGGSGGGGSGGGGSELCLYDP PEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRLGNSWSSNCQC TSNSHDKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCRE PPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTG WTQPQLTCVDEREHHFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTET TAMTETFVLTMKYGGHHHHHH
57	AA	Мышь	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)3-внеклеточный домен IL-2R α + глициновый спейсер и полигистидиновая область	MDSMQLASCVTILTVLLVNSAPTSSSTSSSTAQAQQQQQQQQQQH LEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLMTFKFYLPKQATELKDLCLEDEL GPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLGSDNTFECQFDDESA TVVDFLRWWIAFCQSIISTSPQGGGSGGGGSGGGGSELCLYDP PEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKELVYMRLGNSWSSNCQC TSNSHDKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMHQENLTGHCRE PPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTG WTQPQLTCVDEREHHFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTET TAMTETFVLTMKYGGHHHHHH
58	AA	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)2-внеклеточный домен IL-2R α + глициновый спейсер и полигистидиновая область	MDRMQLLSICIALSLVITNSAPTSSSTKTKQLQLEHLLDLQMLINGINN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISINIVLELKGSETTFMCEYADETATVEFLNRWITFCQSIISTLT GGGSGGGSELCDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGS LYMLCTGNSSHSSWDNQCCQCTSSATRNNTKQVTPQPEEQKERKTTEM QSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEAETRIYHFVVGQMVVYQCVQG YRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLCTGEMETSQFPGEKPKQASP EGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGHHHHHH
59	AA	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)3-внеклеточный домен IL-2R α + глициновый спейсер и полигистидиновая область	MDRMQLLSICIALSLVITNSAPTSSSTKTKQLQLEHLLDLQMLINGINN YKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISINIVLELKGSETTFMCEYADETATVEFLNRWITFCQSIISTLT GGGSGGGSELCDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGS LYMLCTGNSSHSSWDNQCCQCTSSATRNNTKQVTPQPEEQKERKTTEM QSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEAETRIYHFVVGQMVVYQCVQG YRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLCTGEMETSQFPGEKPKQASP EGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGHHHHHH

60	AA	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)4-внеклеточный домен IL-2 R α + глициновый спейсер и полигистидиновая область	MDRMQLLSICALVLTNSAPTSSTSKTKQLQLEHLLDLQMLNGINN YKNPKLTRMLTFKFMPPKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVLVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT GGGSGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNLNCECK RGFRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCTSSATRNNTTKQVTPQPEE QKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQ MVVYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTPQLICTGEMETSQF PGEEKPQASPEGRPESETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGH HHHHH
61	AA	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly4Ser)4-внеклеточный домен IL-2R α + глициновый спейсер и полигистидиновая область	MDRMQLLSICALVLTNSAPTSSTSKTKQLQLEHLLDLQMLNGINN YKNPKLTRMLTFKFMPPKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVLVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNL NCECKRGRFRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCTSSATRNNTTKQVTP QPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFV VGQM VVYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTPQLICTGEME TSQFPGEEKPQASPEGRPESETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEY QGGHHHHHHH
62	AA	Человек	Зрелая форма IL-2 (Gly3Ser)3-внеклеточный домен mutIL-2 R α	APTSSTSKTKQLQLEHLLDLQMLNGINN YKNPKLTRMLTFKFMPPKKA TELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVLVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGSGGGSGGGSELCDDDPP EIPHATFKAMAYKEGTMNLNCECKRGFTSIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDN QCCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQM VVYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTH GKTTRWTPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
63	NT	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly3Ser)3-внеклеточный домен mutIL-2 R α Mut	ATGGACAGGATGCAACTCTGTCTTGCACTGCACTAAGTCTTGCACTT GTCCAAACAGTGCACTACTCAAGTTCTCAAAAGAAAACACAGCT ACAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTACAGATGATTTTGAATGGAAT TAATAATTACAAGAAATCCAAACTCACCAGGATGCTCATTGAAGTT TTACATGCCAAGAAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAG AAGAAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTCTAAATTTAGCTCAAAGC AAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAACATAAGGGATCTGAAACACATTCATGTGTGAATA TGCTGATGAGACAGCAACCATTTAGAAATTTCTGAACAGATGGATTA CCTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTggggaggttctggtaggt ttaggttaggttctgGAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCCAAC CGCCACATTCAAAGCCATGGCTCAAGGAAGGAACCATGTTGAAC GTGAATGCAAGAGAGGTTTCACTCAATAAAAAAGCGGTCACTCTAT ATGCTCTGTACAGGAACCTCTAGCCACTGCTCTGGGACACCAATG TCAATGCACAAAGCTCTGCCACTCGGAACACAAACAAAGTGACAC CTCAACTGAAGAACAGAAAGAAAGGAAACACAGAAATGCAAAAG TCCAATGACGCCAGTGACCAAGCGAGCCTTCCAGGTCACTGCAAGG AACCTCCACCATGGGAAAAAGAACCCAGAGAGAAATTTATCATTTT GTGGTGGGGCAGATGGTTTATATCAGTGCCTCAGGGATACAGGG CTCTACACAGAGGCTCTGCTGAGAGCGCTCTGCAAAATGACCCACG GG AAGACAAGGTGGACCCAGCCCAAGCTCATATGACAGGTGAATGG AGACCAAGTCAAGTTCCAGGTGAAGGAAGCCCTCAGGCAAGCCCGA AGGCCGTCTGAGAGTGAGACTTCTGCTCGTCAACAACAGATT TTCAAATACAGAGAAATGGCTGCAACCATGGAGACGTCATATTT ACAACAGAGTACAGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA
64	AA	Человек	Зрелая форма IL-2 (Gly4Ser)4-внеклеточный домен mutIL-2 R α	APTSSTSKTKQLQLEHLLDLQMLNGINN YKNPKLTRMLTFKFMPPKKA TELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVLVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGSGGGSGGGSGGGSGGG SELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNLNCECKRGFTSIKSGSLYMLCTG NSSHSSWDNQCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQM VVYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESET SLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
65	NT	Человек	Непроцессированная форма IL-2 (Gly4Ser)4-внеклеточный домен mutIL-2 R α	ATGGACAGGATGCAACTCTGTCTTGCACTGCACTAAGTCTTGCACTT GTCCAAACAGTGCACTACTCAAGTTCTCAAAAGAAAACACAGCT ACAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTACAGATGATTTTGAATGGAAT TAATAATTACAAGAAATCCAAACTCACCAGGATGCTCATTGAAGTT TTACATGCCAAGAAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAG AAGAAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTCTAAATTTAGCTCAAAGC AAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAACATAAGGGATCTGAAACACATTCATGTGTGAATA TGCTGATGAGACAGCAACCATTTAGAAATTTCTGAACAGATGGATTA CCTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTggggaggttctggtaggt ttaggttaggttctgGAGCTCTGTGACGATGACCCGCCAGAGATCCCAACG CCAATGCAAGTGAATGCAAG AGCCATGCGCTCAAGGAAGGAACCATGTTGAATGTGAATGCAAG AGAGGTTTCACTCAATAAAAGCGGTCACTTATAGCTCTGTACA GGAACACTAGCCACTGCTCTGGGACACCAATGTCAATGCACAAG CTCTGCCACTCGGAACACAAAGCAAGTGACACCTCAACCTGAAG AACAGAAAGAAAGAAACCAAGAAATGCAAAAGTCAATGCAAGCC AGTGGAACCAAGCGAGCTTCCAGGTCACTGAGGGAACTCCACCAT GGGAAAAAGAACCCAGAGAGAAATTTATCATTTCTGCTGGTGGGGCA GATGGTTTATATCAGTGCCTCAGGGATACAGGGCTCTACACAGAG GTCTGCTGAGAGCGCTCTGCAAAATGACCCAGGGAAGACAGGTG GACCCAGCCCAAGCTCATATGACAGGTGAAATGGAGACCAAGTCA GTTCCAGGTGAAGAGAGCTCAGGCAAGCCCGAAGCCGCTCTGA GAGTGAGAGCTCTGCTCGTCAACAACAG ATTTTCAAATACAGAC AGAAATGGCTGCAACCATGGAGAGCTCATATTTACAACAGAGTACC AGGGTGGACATCACCATCACCATCACTAATAA

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании изобретения, указывают на уровень специалистов в настоящей области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Все публикации и патентные заявки включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация или патентная заявка специально и индивидуально включена посредством ссылки.

Несмотря на то что изложенное выше изобретение было описано более подробно с помощью иллюстрации и примера для целей ясности понимания, будет очевидно, что определенные изменения и модификации можно осуществить на практике в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий:
 - (а) первый полипептид, содержащий интерлейкин-2 (IL-2) или его функциональный фрагмент; и
 - (б) второй полипептид, слитый в пределах рамки считывания с первым полипептидом через линкер, причем второй полипептид содержит внеклеточный домен рецептора интерлейкина-2 альфа (IL-2R α) или его функциональный фрагмент, который способен к связыванию с IL-2;

где линкер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13;

второй полипептид содержит по меньшей мере 150 непрерывно следующих аминокислот из SEQ ID NO: 7; и причем слитый белок характеризуется активностью IL-2.
2. Слитый белок по п.1, где второй полипептид содержит по меньшей мере 155 непрерывно следующих аминокислот из SEQ ID NO: 7.
3. Слитый белок по п.2, где второй полипептид содержит по меньшей мере 160 непрерывно следующих аминокислот из SEQ ID NO: 7.
4. Слитый белок по п.3, где второй полипептид содержит по меньшей мере 165 непрерывно следующих аминокислот из SEQ ID NO: 7.
5. Слитый белок по любому из пп.1-4, причем указанный слитый белок характеризуется увеличенной активностью IL-2 по сравнению с нативным или рекомбинантным IL-2.
6. Слитый белок по любому из пп.1-5, причем указанный слитый белок характеризуется увеличенной стойкой стимуляцией IL-2 несущих IL-2R лимфоцитов *in vivo* по сравнению с нативным или рекомбинантным IL-2.
7. Слитый белок по любому из пп.1-6, в котором первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности относительно SEQ ID NO: 2.
8. Слитый белок по п.7, в котором первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичность последовательности относительно SEQ ID NO: 2.
9. Слитый белок по п.8, в котором первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.
10. Слитый белок по любому из пп.1-9, причем слитый белок содержит одну или несколько замен, делеций, усечений и вставок во внеклеточном домене IL-2R α или его фрагменте.
11. Слитый белок по п.10, в котором внеклеточный домен рецептора IL-2R α или его фрагмент содержит замену Arg35Thr, соответствующую положению 35 SEQ ID NO: 7, и замену Arg36Ser, соответствующую положению 36 SEQ ID NO: 7.
12. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок по любому из пп.1-11.
13. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.12.
14. Клетка-хозяин по п.13, причем клетка-хозяин представляет собой клетку CHO или клетку COS.
15. Способ получения слитого белка по любому из пп.1-11, причем способ включает введение в клетку-хозяина полинуклеотида, кодирующего слитый белок по любому из пп.1-11, и экспрессию слитого белка в клетке-хозяине.
16. Способ по п.15, при котором полинуклеотид, кодирующий слитый белок, является функционально связанным с промотором, активным в клетке-хозяине.
17. Применение слитого белка по любому из пп.1-11 для изготовления лекарственного средства для уменьшения иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом.
18. Применение по п.17, при котором указанный субъект характеризуется наличием аутоиммунного заболевания.
19. Применение по п.18, при котором аутоиммунное заболевание включает в себя сахарный диабет I типа, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, глютеновую энтеропатию, системную красную волчанку, ювенильный идиопатический артрит, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит или системный склероз, реакцию "трансплантат против хозяина", псориаз, гнездную алопецию или индуцированный вирусом гепатита C (HCV) васкулит.
20. Применение по любому из пп.17-19, при котором терапевтически эффективное количество слитого белка содержит 10^3 - 10^6 МЕ активности IL-2 на организм взрослого или $10^4 \pm 100$ -кратную активность IL-2 на субъекта.
21. Применение слитого белка по любому из пп.1-11 для изготовления лекарственного средства для усиления иммуногенности вакцины у субъекта, нуждающегося в этом.
22. Применение слитого белка по любому из пп.1-11 для изготовления лекарственного средства для преодоления подавленного иммунного ответа на вакцину у субъекта, нуждающегося в этом.
23. Применение по п.21 или 22, при котором слитый белок и вакцина предназначены для последовательного введения в любом порядке.
24. Применение по п.21 или 22, при котором слитый белок и вакцина предназначены для одновременного введения.

25. Применение по любому из пп.21-24, при котором вакцина представляет собой противораковую вакцину.

26. Применение по любому из пп.21-25, при котором терапевтически эффективное количество слитого белка составляет по меньшей мере 10^4 - 10^7 МЕ активности IL-2 на организм взрослого или по меньшей мере $10^5 \pm 100$ активность IL-2 на субъекта.

27. Применение по любому из пп.17-26, при котором субъект представляет собой человека.

28. Способ снижения иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп.1-11.

29. Способ усиления иммуногенности вакцины у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

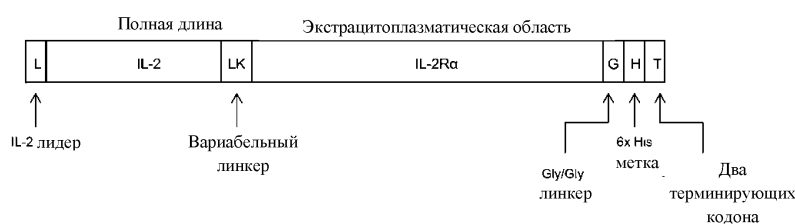
(a) введение субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп.1-11 и

(b) введение субъекту вакцины.

30. Способ преодоления подавленного иммунного ответа на вакцину у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

(а) введение субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп.1-11 и

(b) введение субъекту вакцины.



ФИГ. 1

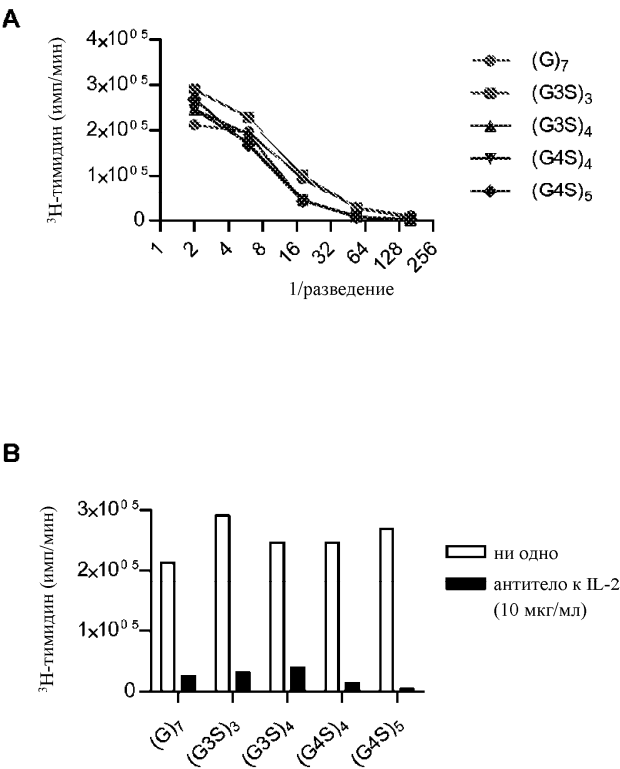
Предсказанная последовательность белка

Конструкт	Последовательность
IL-2	MYSHQGLASCVTLTLVLLVNSAPTSSSTSSSTRAEQQQQQQQQQQQHLEQLLMDQLLELS
IL-2-(G4S)4-IL-2Ra	MDSHQGLASCVTLTLVLLVNSAPTSSSTSSSTRAEQQQQQQQQQQQHLEQLLMDQLLELS
IL-2-(G4S)5-IL-2Ra	MDSHQGLASCVTLTLVLLVNSAPTSSSTSSSTRAEQQQQQQQQQQQHLEQLLMDQLLELS
IL-2-(G3S)4-IL-2Ra	MDSHQGLASCVTLTLVLLVNSAPTSSSTSSSTRAEQQQQQQQQQQQHLEQLLMDQLLELS
IL-2-(G3S)3-IL-2Ra	MDSHQGLASCVTLTLVLLVNSAPTSSSTSSSTRAEQQQQQQQQQQQHLEQLLMDQLLELS
IL-2Ra	
IL-2	RNENYRNILKPRMLTFKFFLPKQATELKDQLCEDELGLPLRHVLDTQSKSPQLEDAENF
IL-2-(G4S)4-IL-2Ra	RNENYRNILKPRMLTFKFFLPKQATELKDQLCEDELGLPLRHVLDTQSKSPQLEDAENF
IL-2-(G4S)5-IL-2Ra	RNENYRNILKPRMLTFKFFLPKQATELKDQLCEDELGLPLRHVLDTQSKSPQLEDAENF
IL-2-(G3S)4-IL-2Ra	RNENYRNILKPRMLTFKFFLPKQATELKDQLCEDELGLPLRHVLDTQSKSPQLEDAENF
IL-2-(G3S)3-IL-2Ra	RNENYRNILKPRMLTFKFFLPKQATELKDQLCEDELGLPLRHVLDTQSKSPQLEDAENF
IL-2Ra	
IL-2	ISNIIRVTYVKLKGSNDTFECQFDDESAATVDFLRHWIAFCQSIISTSPQGGGGGGGGG
IL-2-(G4S)4-IL-2Ra	ISNIIRVTYVKLKGSNDTFECQFDDESAATVDFLRHWIAFCQSIISTSPQGGGGGGGGG
IL-2-(G4S)5-IL-2Ra	ISNIIRVTYVKLKGSNDTFECQFDDESAATVDFLRHWIAFCQSIISTSPQGGGGGGGGG
IL-2-(G3S)4-IL-2Ra	ISNIIRVTYVKLKGSNDTFECQFDDESAATVDFLRHWIAFCQSIISTSPQGGGGGGGGG
IL-2-(G3S)3-IL-2Ra	ISNIIRVTYVKLKGSNDTFECQFDDESAATVDFLRHWIAFCQSIISTSPQGGGGGGGGG
IL-2Ra	
IL-2	-----CGGGGGGGLCLDYPPEVPVPAFTKALSYNGTGLANCECKRGFRALKLELVYMRCL
IL-2-(G4S)4-IL-2Ra	CGGGGGGGGGGGLCLDYPPEVPVPAFTKALSYNGTGLANCECKRGFRALKLELVYMRCL
IL-2-(G4S)5-IL-2Ra	CGGGGGGGGGGGLCLDYPPEVPVPAFTKALSYNGTGLANCECKRGFRALKLELVYMRCL
IL-2-(G3S)4-IL-2Ra	CGGGGGGGGGLCLDYPPEVPVPAFTKALSYNGTGLANCECKRGFRALKLELVYMRCL
IL-2-(G3S)3-IL-2Ra	CGGGGGGGLCLDYPPEVPVPAFTKALSYNGTGLANCECKRGFRALKLELVYMRCL
IL-2Ra	ELCLDYPPEVPVPAFTKALSYNGTGLANCECKRGFRALKLELVYMRCL
IL-2	
IL-2-(G4S)4-IL-2Ra	GNSSNSNCCQTSNSHOKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMQENLTGHCREFPPPW
IL-2-(G4S)5-IL-2Ra	GNSSNSNCCQTSNSHOKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMQENLTGHCREFPPPW
IL-2-(G3S)4-IL-2Ra	GNSSNSNCCQTSNSHOKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMQENLTGHCREFPPPW
IL-2-(G3S)3-IL-2Ra	GNSSNSNCCQTSNSHOKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMQENLTGHCREFPPPW
IL-2Ra	GNSSNSNCCQTSNSHOKSRKQVTAQLEHQEQQTITDMQKPTQSMQENLTGHCREFPPPW
IL-2	
IL-2-(G4S)4-IL-2Ra	XHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICMKCGCKTGWTGPQTQPCVDERHH
IL-2-(G4S)5-IL-2Ra	XHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICMKCGCKTGWTGPQTQPCVDERHH
IL-2-(G3S)4-IL-2Ra	XHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICMKCGCKTGWTGPQTQPCVDERHH
IL-2-(G3S)3-IL-2Ra	XHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICMKCGCKTGWTGPQTQPCVDERHH
IL-2Ra	XHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICMKCGCKTGWTGPQTQPCVDERHH
IL-2	
IL-2-(G4S)4-IL-2Ra	RFALASEZSGGRSNSPSESTSCPIITTFDPPQPTETIAMTFVTLMEYKGGHHNNHH
IL-2-(G4S)5-IL-2Ra	RFALASEZSGGRSNSPSESTSCPIITTFDPPQPTETIAMTFVTLMEYKGGHHNNHH
IL-2-(G3S)4-IL-2Ra	RFALASEZSGGRSNSPSESTSCPIITTFDPPQPTETIAMTFVTLMEYKGGHHNNHH
IL-2-(G3S)3-IL-2Ra	RFALASEZSGGRSNSPSESTSCPIITTFDPPQPTETIAMTFVTLMEYKGGHHNNHH
IL-2Ra	RFALASEZSGGRSNSPSESTSCPIITTFDPPQPTETIAMTFVTLMEYKGGHHNNHH

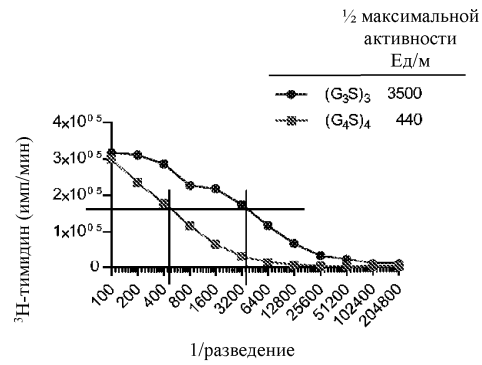
Фиг. 2А

IL-2	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIINGINNYKNPKLTRML
IL-2 (G3S) 2 - IL-2R α	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIINGINNYKNPKLTRML
IL-2 (G3S) 3 - IL-2R α	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIINGINNYKNPKLTRML
IL-2 (G3S) 4 - IL-2R α	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIINGINNYKNPKLTRML
IL-2 (G4S) 4 - IL-2R α	MDRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIINGINNYKNPKLTRML
IL-2R α	-----
IL-2	TFKFYMPKKAATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSE
IL-2 (G3S) 2 - IL-2R α	TFKFYMPKKAATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSE
IL-2 (G3S) 3 - IL-2R α	TFKFYMPKKAATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSE
IL-2 (G3S) 4 - IL-2R α	TFKFYMPKKAATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSE
IL-2 (G4S) 4 - IL-2R α	TFKFYMPKKAATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSE
IL-2R α	-----
IL-2	TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIISTLT-----
IL-2 (G3S) 2 - IL-2R α	TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIISTLTGGGS-----GGGSELDDDP
IL-2 (G3S) 3 - IL-2R α	TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIISTLTGGGS-----GGGSGGSELDDDP
IL-2 (G3S) 4 - IL-2R α	TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIISTLTGGSGGG---SGGSGGSELDDCP
IL-2 (G4S) 4 - IL-2R α	TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIISTLTGGSGGGGGGGSGGSGGSELDDDP
IL-2R α	-----ELCDDDP
IL-2	PEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCCQTSSATR
IL-2 (G3S) 2 - IL-2R α	PEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCCQTSSATR
IL-2 (G3S) 3 - IL-2R α	PEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCCQTSSATR
IL-2 (G3S) 4 - IL-2R α	PEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCCQTSSATR
IL-2 (G4S) 4 - IL-2R α	PEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCCQTSSATR
IL-2R α	-----
IL-2	NTTKQVTPQPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWNEATERIYHFVVGQMV
IL-2 (G3S) 2 - IL-2R α	NTTKQVTPQPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWNEATERIYHFVVGQMV
IL-2 (G3S) 3 - IL-2R α	NTTKQVTPQPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWNEATERIYHFVVGQMV
IL-2 (G3S) 4 - IL-2R α	NTTKQVTPQPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWNEATERIYHFVVGQMV
IL-2 (G4S) 4 - IL-2R α	NTTKQVTPQPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWNEATERIYHFVVGQMV
IL-2R α	NTTKQVTPQPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWNEATERIYHFVVGQMV
IL-2	-----
IL-2 (G3S) 2 - IL-2R α	YYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPE
IL-2 (G3S) 3 - IL-2R α	YYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPE
IL-2 (G3S) 4 - IL-2R α	YYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPE
IL-2 (G4S) 4 - IL-2R α	YYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPE
IL-2R α	YYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPE
IL-2	-----
IL-2 (G3S) 2 - IL-2R α	SETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGHHHHHH
IL-2 (G3S) 3 - IL-2R α	SETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGHHHHHH
IL-2 (G3S) 4 - IL-2R α	SETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGHHHHHH
IL-2 (G4S) 4 - IL-2R α	SETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQGGHHHHHH
IL-2R α	SETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ-----

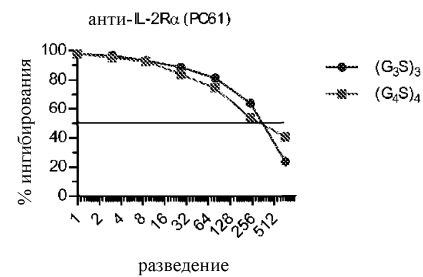
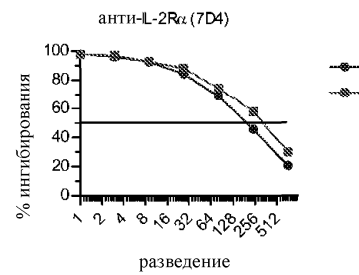
Фиг. 2В



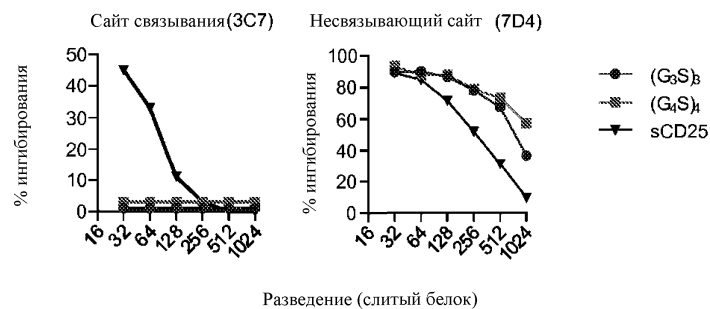
Фиг. 3



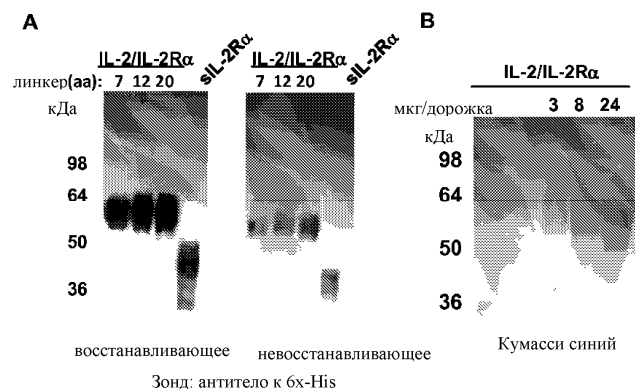
В



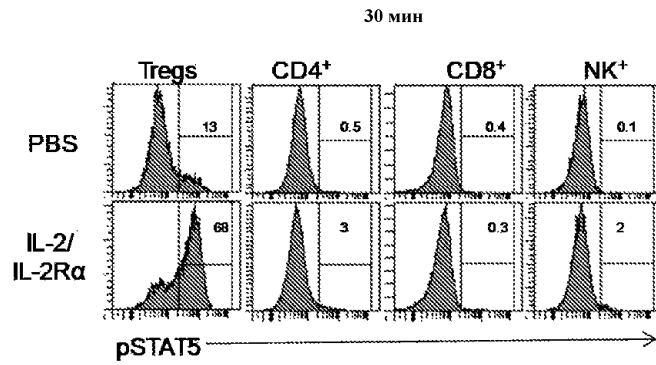
Фиг. 4



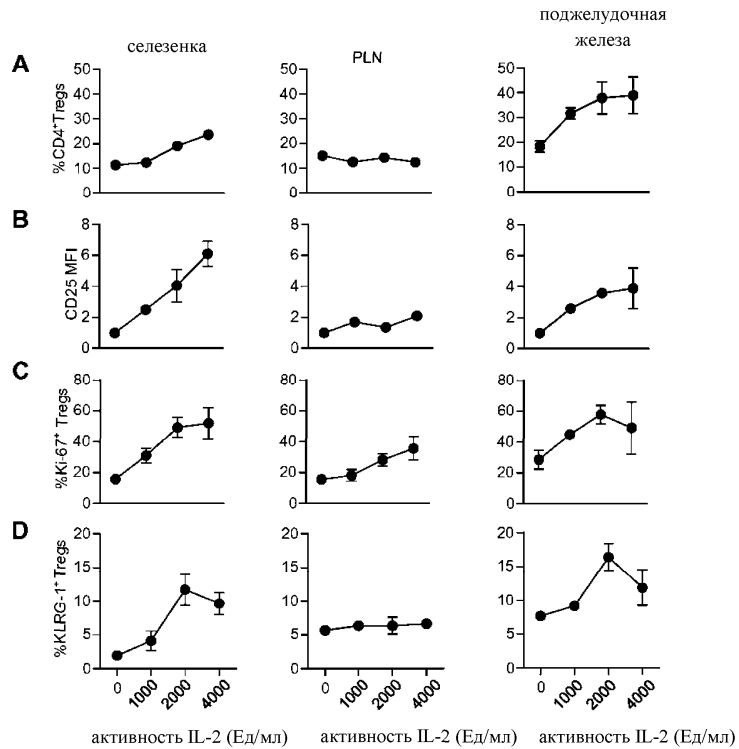
Фиг. 5



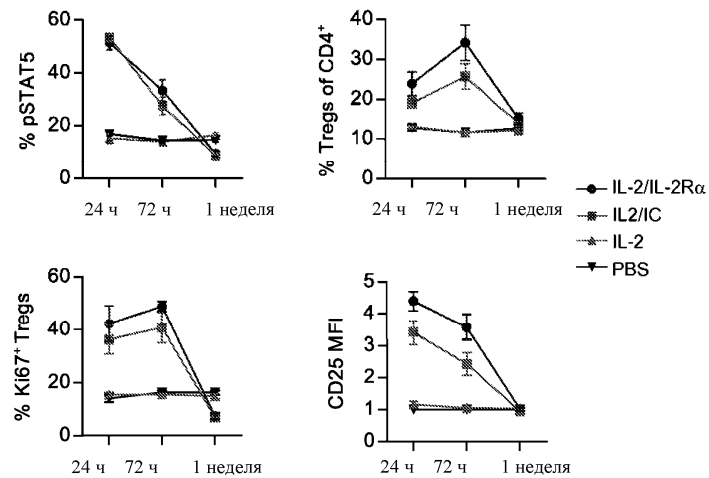
Фиг. 6



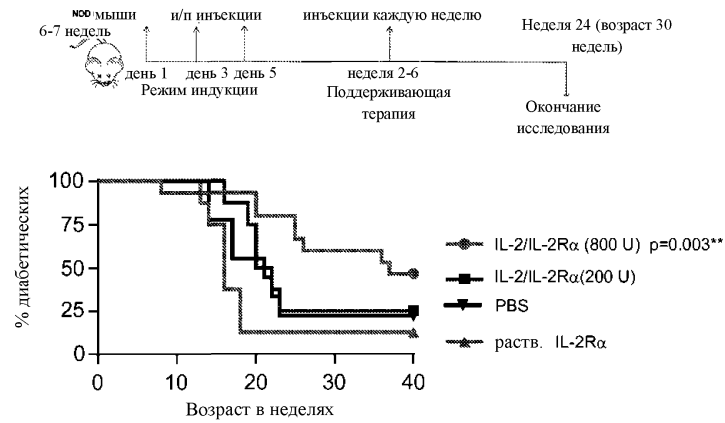
Фиг. 7



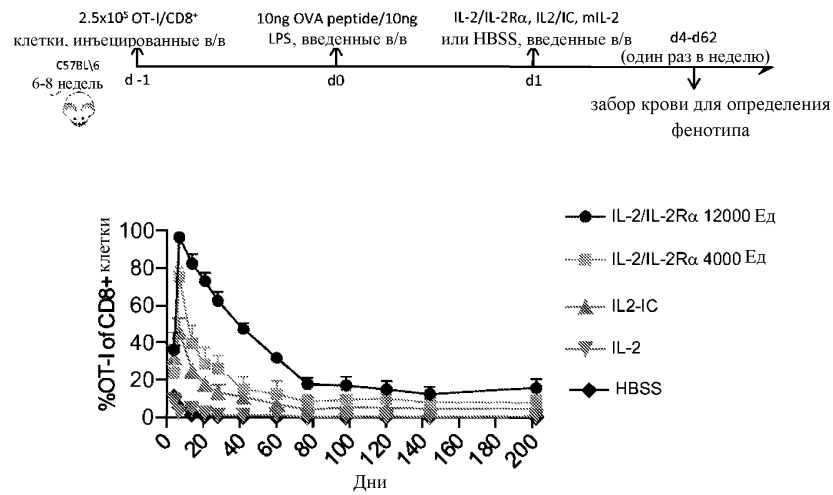
Фиг. 8



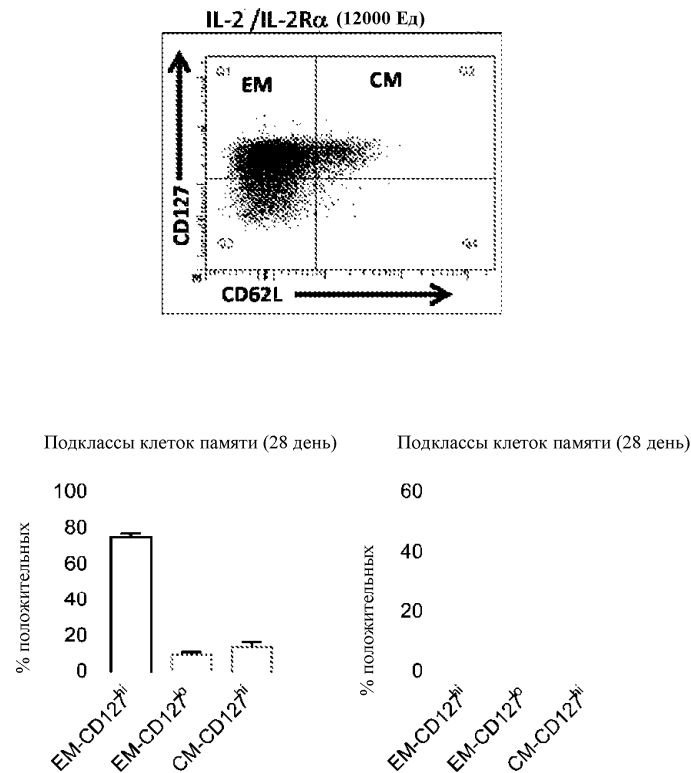
Фиг. 9



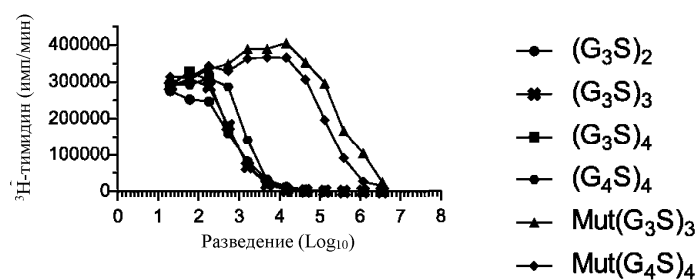
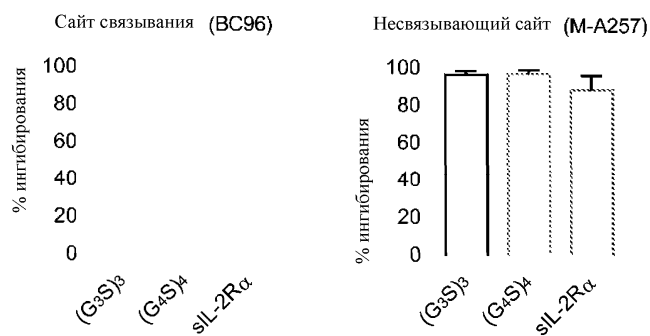
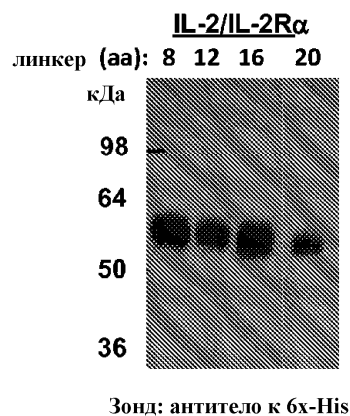
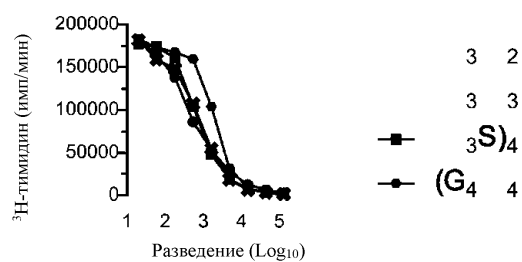
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 15

