

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291284 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.17

(51) Int. Cl. C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/56 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.09

(54) АКТИВИРУЕМЫЕ ЦИТОКИНОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

(31) 63/008,542; 63/161,889; 63/164,849

(32) 2020.04.10; 2021.03.16; 2021.03.23

(33) US

(86) PCT/US2021/026675

(87) WO 2021/207669 2021.10.14

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

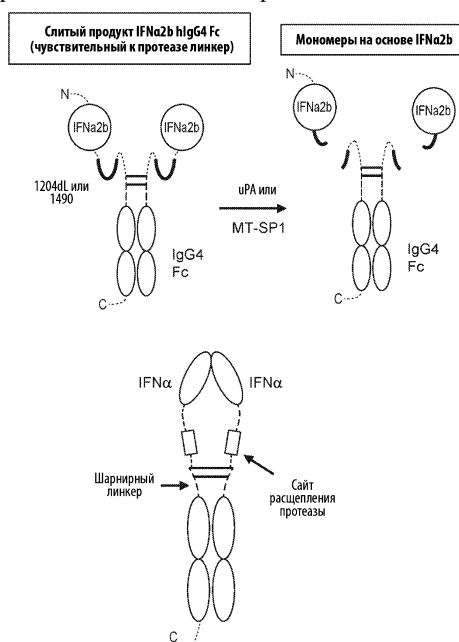
(72) Изобретатель:

Митра Сайантан, Лапуйаде
Николь Г., Асси Хикмат Хайзар,
Паидхунгат Мадан М., Дэниел
Дилан Л. (US), Ле Сколан Эрван (FR),
Богданофф Уолтер А. (US), Цай На
(CN), Ван Синь (TW)

(74) Представитель:

Тагбергенова М.М., Тагбергенова А.Т.
(KZ)

(57) В изобретении представлены активируемые цитокиновые конструкции, которые содержат (a) первую мономерную конструкцию, содержащую первый зрелый цитокиновый белок (CP1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1), при этом CM1 расположен между CP1 и DD1; и (b) вторую мономерную конструкцию, содержащую второй зрелый цитокиновый белок (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2), при этом CM2 расположен между CP2 и DD2, при этом CM1 и CM2 функционируют в качестве субстрата для протеазы; DD1 и DD2 связывают друг друга; и при этом АСС характеризуется снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2.



A1

202291284

202291284

A1

АКТИВИРУЕМЫЕ ЦИТОКИНОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка претендует на преимущество приоритета предварительных заявок США под номерами 63/008542, поданной 10 апреля 2020 г., 63/161889, поданной 16 марта 2021 г. и 63/164849, поданной 23 марта 2021 г., полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

Настоящая заявка была подана вместе с перечнем последовательностей в электронной форме. Файл перечня последовательностей называется «CYTX-071-RCT_ST25.txt», создан 7 апреля 2021 г. и имеет размер 379000 байт. Информация о перечне последовательностей в электронном формате включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и более конкретно к активируемым цитокиновым конструкциям.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Цитокины представляют собой семейство встречающихся в природе малых белков и гликопротеинов, продуцируемых и секретируемых большинством ядерных клеток в ответ на вирусную инфекцию и/или другие антигенные раздражители. Интерфероны представляют собой подкласс цитокинов. Интерфероны в настоящее время сгруппированы в три основных класса: интерферон типа I, интерферон типа II и интерферон типа III. Интерфероны проявляют свою клеточную активность, связываясь со специфическими мембранными рецепторами на клеточной поверхности.

Терапия интерферонами имеет много клинических преимуществ. Например, известно, что интерфероны активируют иммунную систему, а также обладают противовирусными и антипролиферативными свойствами. Эти биологические свойства привели к клиническому использованию интерферонов в качестве терапевтических средств для лечения вирусных инфекций и злокачественных новообразований. Кроме того, интерфероны применимы для привлечения врожденной иммунной системы пациента к обнаружению раковых клеток и воздействию на них. Соответственно, терапия интерферонами широко используется при раке и противовирусной терапии, в том числе для лечения гепатита, саркомы Капоши, волосатоклеточного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза (CML), фолликулярной лимфомы, почечно-клеточного рака (RCC), меланомы и других болезненных состояний. Однако системное

введение интерферонов сопровождается дозозависимыми видами токсичности, в том числе значительными гриппоподобными симптомами, неврологическими симптомами, гепатотоксичностью, угнетением функции костного мозга и аритмией, среди прочих. В исследовании пациентов с меланомой комбинация пембролизумаба и пегилированного IFNa приводила к ORR, составляющей 60,5%. Комбинированное лечение также было ассоциировано с 49% нежелательных явлений G3/G4, которые требовали снижения дозы пегилированного IFNa (Davar et al., J. Clin. Oncol., 2018). Эти нежелательные побочные эффекты ограничивают дозировку терапии интерферонами и иногда приводят к прекращению или задержке лечения интерферонами.

Интерлейкины представляют собой еще один подкласс цитокинов. Интерлейкины регулируют рост, дифференцировку и подвижность клеток. Они особенно важны для стимуляции иммунных реакций, таких как воспаление. Интерлейкины применялись для лечения рака, аутоиммунных нарушений и других нарушений. Например, интерлейкин-2 (IL2) показан для лечения мелаомы, реакции «трансплантат против хозяина» (GVHD), нейробластомы, почечно-клеточного рака (RCC), а также считается применимым при состояниях, включая острый коронарный синдром, острый миелоидный синдром, атопический дерматит, аутоиммунные заболевания печени, базально-клеточную карциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, кандидоз, колоректальный рак, кожную Т-клеточную лимфому, эндометриомы, инфекцию HIV, ишемическую болезнь сердца, ревматоидный артрит, аденокарциному носоглотки, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), рак яичников, рак поджелудочной железы, системную красную волчанку, туберкулез и другие нарушения. Другие интерлейкины, такие как IL-6, IL-7, IL-12 и IL-21, среди прочих, являются потенциальными средствами для лечения различных видов рака и других нарушений. Терапия интерлейкинами часто сопровождается нежелательными побочными эффектами, в том числе гриппоподобными симптомами, тошнотой, рвотой, диареей, низким кровяным давлением и аритмией, среди прочих.

Таким образом, необходимость и стремление к повышению специфичности и селективности цитокиновой терапии в отношении требуемой мишени представляет большой интерес. Повышенное нацеливание цитокиновых терапевтических средств на участок заболевания может снизить токсичность, основанную на системных механизмах, и привести к более широкому терапевтическому применению.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении представлены активируемые цитокиновые

конструкции (ACC), которые содержат: (а) первый мономер, содержащий первый зрелый цитокиновый белок (CP1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1), при этом CM1 расположен между CP1 и DD1; и (b) второй мономер, содержащий второй зрелый цитокиновый белок (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2), при этом CM2 расположен между CP2 и DD2, при этом CM1 и CM2 функционируют в качестве субстрата для протеазы; DD1 и DD2 связывают друг друга; и при этом ACC характеризуется снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2. Протеазы, расщепляющие CM1 и CM2, могут иметь повышенную экспрессию в пораженной ткани (например, опухолевой ткани) по сравнению со здоровой тканью. ACC может активироваться при расщеплении CM1 и/или CM2, так что цитокин может проявлять свою активность в пораженной ткани (например, в микроокружении опухоли), в то время как цитокиновая активность ослабляется в контексте здоровой ткани. Таким образом, ACC, представленные в данном документе, могут обеспечивать меньшую токсичность по сравнению с традиционными цитокиновыми терапевтическими средствами, обеспечивать более высокие эффективные дозировки цитокинов, и/или повышать терапевтическое окно для цитокина.

В данном документе представлены активируемые цитокиновые конструкции (ACC), которые содержат первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, при этом (а) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый цитокиновый белок (CP1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1), при этом CM1 расположен между CP1 и DD1; и (b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый цитокиновый белок (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2), при этом CM2 расположен между CP2 и DD2; при этом DD1 и DD2 связывают друг друга, образуя таким образом димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и при этом ACC характеризуется сниженным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2.

В настоящем изобретении представлены активируемые цитокиновые конструкции (ACC), которые содержат: (а) первый мономер, содержащий первый зрелый цитокиновый белок (CP1), первый домен димеризации (DD1); и (b) второй мономер, содержащий второй зрелый цитокиновый белок (CP2), расщепляемый

фрагмент (CM) и второй домен димеризации (DD2), при этом CM расположен между CP2 и DD2, при этом CM функционирует в качестве субстрата для протеазы; DD1 и DD2 связывают друг друга; и при этом АСС характеризуется снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2.

В настоящем изобретении представлены активируемые цитокиновые конструкции (АСС), которые содержат: (а) первый мономер, содержащий первый зрелый цитокиновый белок (CP1), расщепляемый фрагмент (CM) и первый домен димеризации (DD1), при этом CM расположен между CP1 и DD1; и (b) второй мономер, содержащий второй зрелый цитокиновый белок (CP2) и второй домен димеризации (DD2), при этом CM функционирует в качестве субстрата для протеазы; DD1 и DD2 связывают друг друга; и при этом АСС характеризуется снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2.

В настоящем изобретении представлены активируемые цитокиновые конструкции (АСС), которые содержат: (а) первый мономер, содержащий первый зрелый цитокиновый белок (CP1) и первый домен димеризации (DD1); и (b) второй мономер, содержащий второй зрелый цитокиновый белок (CP2) и второй домен димеризации (DD2), при этом CP1, CP2 или как CP1, так и CP2 содержат аминокислотную последовательность, которая функционирует в качестве субстрата для протеазы; DD1 и DD2 связывают друг друга; и при этом АСС характеризуется снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2.

АСС по настоящему изобретению характеризуются тем, что CP1 и CP2 не связаны с пептидными масками, например, маскирующими аффинность фрагментами.

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит первый полипептид, который содержит CP1, CM1 и DD1. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, который содержит CP2, CM2 и DD2. В некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 представляют собой пару, выбранную из группы, состоящей из пары доменов Fc, домена sushi из альфа-цепи рецептора IL-15 человека (IL15R α) и растворимого IL-15; барназы и барнстара; протеинкиназы A (PKA) и якорного белка A-киназы (AKAP); модулей тегов адаптер/докинг на основе мутированных фрагментов РНКазы I; эпитопа и однодоменного антитела (sdAb);

эпитопа и одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv); и модулей растворимых N-этилмалеимид-чувствительных белковых рецепторов прикрепления (SNARE) на основе взаимодействий белков синтаксина, синаптотагмина, синаптобревина и SNAP25, антигенсвязывающего домена и эпитопа. В некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 представляют собой пару доменов Fc. В некоторых вариантах осуществления пара Fc-доменов представляет собой пару Fc-доменов человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-домены человека представляют собой Fc-домены IgG1 человека, Fc-домены IgG2 человека, Fc-домены IgG3 человека или Fc-домены IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-домены человека представляют собой Fc-домены IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-домены человека содержат последовательность, на по меньшей мере 80% идентичную SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления каждый из Fc-доменов человека содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления каждый из Fc-доменов человека содержит SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 являются одинаковыми. Например, DD1 и DD2 могут представлять собой пару идентичных Fc-доменов IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления домены димеризации имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 315 и 316 соответственно. В некоторых вариантах осуществления Fc-домены человека содержат мутации для устранения гликозилирования и/или для снижения связывания Fc-гамма-рецепторов. В некоторых вариантах осуществления Fc-домены человека содержат мутацию N297Q, N297A или N297G; в некоторых вариантах осуществления Fc-домены человека содержат мутацию в положении 234 и/или 235, например, L235E, или L234A и L235A (в IgG1), или F234A и L235A (в IgG4); в некоторых вариантах осуществления Fc-домены человека представляют собой Fc-домены IgG2, которые содержат мутации V234A, G237A, P238S, H268Q/A, V309L, A330S или P331S или их комбинацию (все в соответствии с EU-нумерацией).

Дополнительные примеры сконструированных доменов Fc человека известны специалистам в данной области техники. Примеры аминокислот константной области тяжелой цепи Ig, в которых мутации по меньшей мере в одной аминокислоте приводят к снижению функции Fc, включают без ограничения мутации в аминокислоте 228, 233, 234, 235, 236, 237, 239, 252, 254, 256, 265, 270, 297, 318, 320, 322, 327, 329, 330 и 331 константой области тяжелой цепи (в соответствии с EU-нумерацией). Примеры

комбинаций мутантных аминокислот также известны в данной области техники, такие как без ограничения комбинация мутаций в аминокислотах 234, 235 и 331, такая как L234F, L235E и P331S, или комбинация аминокислот 318, 320 и 322, например, E318A, K320A и K322A.

Дополнительные примеры сконструированных Fc-доменов включают F243L/R292P/Y300L/V305I/P396 IgG1; S239D/I332E IgG1; S239D/I332E/A330L IgG1; S298A/E333A/K334A; в одной тяжелой цепи L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A IgG1, и в противоположной тяжелой цепи D270E/K326D, A330M/K334E IgG; G236A/S239D/I332E IgG1; K326W/E333S IgG1; S267E/H268F/S324T IgG1; E345R/E430G/S440Y IgG1; N297A или N297Q or N297G IgG1; L235E IgG1; L234A/L235A IgG1; F234A/L235A IgG4; H268Q/V309L/A330S/P331S IgG2; V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S IgG2; M252Y/S254T/T256E IgG1; M428L/N434S IgG1; S267E/L328F IgG1; N325S/L328F IgG1 и т.п. В некоторых вариантах осуществления сконструированный Fc-домен содержит одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из N297A IgG1, N297Q IgG1 и S228P IgG4.

В некоторых вариантах осуществления DD1 содержит антигенсвязывающий домен, а DD2 содержит соответствующий эпитоп. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен к His-тегу, и при этом DD2 содержит His-тег. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из DD1 и DD2 содержит заместитель домена димеризации, выбранный из группы, состоящей из неполипептидного полимера и малой молекулы. В некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 содержат неполипептидные полимеры, ковалентно связанные друг с другом. В некоторых вариантах осуществления неполипептидный полимер представляет собой серосодержащий полиэтиленгликоль, и при этом DD1 и DD2 ковалентно связаны друг с другом посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из DD1 и DD2 содержит малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления малая молекула представляет собой биотин. В некоторых вариантах осуществления DD1 содержит биотин, а DD2 содержит авидин.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 представляют собой зрелые цитокины. В некоторых вариантах осуществления каждый из CP1 и CP2 содержит последовательность зрелого цитокина и дополнительно содержит сигнальный пептид (также обозначаемый в данном документе «сигнальной последовательностью»). В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2, каждый в отдельности, выбран(ы) из группы, состоящей из интерферона, интерлейкина, GM-CSF, G-CSF, LIF, OSM, CD154, LT- β , TNF- α , TNF- β , 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE, TGF- β 1, TGF- β 1, TGF- β 3, EPO, TPO, Flt-3L, SCF, M-CSF и MSP. CP1 и/или CP2 может(гут) представлять собой последовательность человека или отличного от человека животного дикого типа, мутантную последовательность, усеченную последовательность, гибридную последовательность или последовательность, содержащую вставки. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 являются разными, и настоящее изобретение включает выбор и комбинацию любых двух цитокиновых белков, перечисленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 представляет(ют) собой интерферон. В некоторых вариантах осуществления как CP1, так и CP2 представляет собой интерферон. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 представляют собой разные интерфероны. В некоторых вариантах осуществления CP1 и CP2 представляют собой одинаковый интерферон. В некоторых вариантах осуществления CP1 или CP2 представляет собой интерферон. В некоторых вариантах осуществления один из CP1 и CP2 представляет собой интерферон, а другой из CP1 или CP2 представляет собой цитокин, отличный от интерферона. В некоторых аспектах один или оба цитокина представляют собой мономерные цитокины. В некоторых аспектах один или оба интерферона представляют собой мономерные интерфероны. В некоторых аспектах CP1 или CP2 представляет собой мономерный интерферон, а другой CP1 или CP2 представляет собой другой цитокин. В некоторых аспектах CP1 и/или CP2 содержит(ат) мутантную последовательность цитокина. В некоторых аспектах CP1 и/или CP2 содержит(ат) универсальную последовательность цитокина. В некоторых аспектах CP1 и/или CP2 содержит(ат) усеченную последовательность, которая сохраняет цитокиновую активность.

В некоторых вариантах осуществления интерферон(ы) представляет(ют) собой зрелый интерферон человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления интерферон(ы) может(гут) представлять собой интерфероны типа I и типа II, например,

включая без ограничения интерферон-альфа, интерферон-бета, интерферон-омега, интерферон-гамма и интерферон-тау. В некоторых вариантах осуществления интерферон(ы) представляет(ют) собой интерферон-альфа. В некоторых вариантах осуществления интерферон(ы) выбран(ы) из группы, состоящей из интерферона альфа-2a, интерферона альфа-2b и интерферона альфа-n3. В некоторых вариантах осуществления интерферон(ы) представляет(ют) собой интерферон альфа-2b. В некоторых вариантах осуществления интерферон(ы) представляет(ют) собой мутантный интерферон. В некоторых вариантах осуществления интерферон(ы) представляет(ют) собой мутантный интерферон, при этом сайт расщепления эндогенной протеазы стал нефункциональным в результате замены, делеции или вставки одной или нескольких аминокислот. В некоторых вариантах осуществления интерферон(ы) представляет(ют) собой универсальную цитокиновую молекулу, например, имеющую гибридную последовательность разных подтипов цитокинов, или химерную последовательность цитокина, или гуманизованную последовательность цитокина. В некоторых вариантах осуществления интерферон(ы) представляет(ют) собой универсальную молекулу интерферона. В некоторых вариантах осуществления интерферон(ы) представляет(ют) собой универсальный интерферон альфа, например, гибрид интерферона альфа 1 и интерферона альфа 2b. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или на 99% идентична SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления интерферон представляет собой интерферон бета. В некоторых вариантах осуществления интерферон бета выбран из группы, состоящей из интерферона бета-1a и интерферона бета-1b. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) домен IFab. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) интерлейкин. В некоторых вариантах осуществления интерлейкин выбран из группы, состоящей из IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-18, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-10, IL-20, IL-14, IL-16 и IL-17.

В некоторых вариантах осуществления CM1 и/или CM2 содержит(ат) в целом от приблизительно 3 аминокислот до приблизительно 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 содержат субстраты для разных протеаз. В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 имеют одинаковую длину и содержат

одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 содержат субстраты для одной и той же протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза(ы) выбрана(ы) из группы, состоящей из ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, BACE, ренина, катепсина D, катепсина E, каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 14, катепсина B, катепсина C, катепсина K, катепсина L, катепсина S, катепсина V/L2, катепсина X/Z/P, крузипаина, легумаина, отубаина-2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, KLK14, меприна, неприлизина, PSMA, BMP-1, матриксных металлопротеиназ (например, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-24, MMP-26, MMP-27), активированного белка C, катепсина A, катепсина G, химазы, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, эластазы, гранзима B, гуанидинобензоатазы, HtrA1, нейтрофиллиазы человека, лактоферрина, марапсина, NS3/4A, PACE4, плазмина, PSA, tPA, тромбина, триптазы, uPA, DESC1, DPP-4, FAP, гепсина, матриптазы-2, MT-SP1/матриптазы, TMPRSS2, TMPRSS3 и TMPRSS4. В некоторых вариантах осуществления протеаза(ы) выбрана(ы) из группы, состоящей из uPA, легумаина, MT-SP1, ADAM17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13 и MMP-14.

Подходящие расщепляемые фрагменты были описаны в WO 2010/081173, WO 2015/048329, WO 2015/116933, WO 2016/118629 и WO 2020/118109, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки в их полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления CM1 и/или CM2 содержит(ат) последовательность, выбранную из группы, состоящей из LSGRSDNH (SEQ ID NO: 5), TGRGPSWV (SEQ ID NO: 6), PLTGRSGG (SEQ ID NO: 7), TARGPSFK (SEQ ID NO: 8), NTLSGRSEHSHG (SEQ ID NO: 9), NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 10), TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 11), TSGRSANP (SEQ ID NO: 12), VHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 13), AVGLLAPP (SEQ ID NO: 14), AQNLLGMV (SEQ ID NO: 15), QNQALRMA (SEQ ID NO: 16), LAAPLGLL (SEQ ID NO: 17), STFPFGMF (SEQ ID NO: 18), ISSGLLSS (SEQ ID NO: 19), PAGLWLDP (SEQ ID NO: 20), VAGRSMRP (SEQ ID NO: 21), VVPEGRRS (SEQ ID NO: 22), ILPRSPAF (SEQ ID NO: 23), MVLGRSLL (SEQ ID NO: 24), QGRAITFI (SEQ ID NO: 25), SPRSIMLA (SEQ ID NO: 26), SMLRSMPL (SEQ ID NO: 27), ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 29), ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 30), LSGRSGNH (SEQ ID NO:

31), SGRSANPRG (SEQ ID NO: 32), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), LSGRSDIH (SEQ ID NO: 34), LSGRSDQH (SEQ ID NO: 35), LSGRSDTH (SEQ ID NO: 36), LSGRSDYH (SEQ ID NO: 37), LSGRSDNP (SEQ ID NO: 38), LSGRSANP (SEQ ID NO: 39), LSGRSANI (SEQ ID NO: 40), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 41), MIAPVAYR (SEQ ID NO: 42), RPSPMWAY (SEQ ID NO: 43), WATPRPMR (SEQ ID NO: 44), FRLLDWQW (SEQ ID NO: 45), ISSGL (SEQ ID NO: 46), ISSGLLS (SEQ ID NO: 47), ISSGLL (SEQ ID NO: 48), ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 49), AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 50), AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 51), ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 52), ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 53), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 55), ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 56), ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 57), ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 58), ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 59), AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 60), AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 61), AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 62), AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 63), AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 64), AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 65), AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 66), AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 67), ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68), AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 69), GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 70), GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 71), LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 72), ISSGLSS (SEQ ID NO: 73), PVGYTSSL (SEQ ID NO: 74), DWLYWPGI (SEQ ID NO: 75), LKAAPRWA (SEQ ID NO: 76), GPSHLVLT (SEQ ID NO: 77), LPGGLSPW (SEQ ID NO: 78), MGLFSEAG (SEQ ID NO: 79), SPLPLRVP (SEQ ID NO: 80), RMHLRSLG (SEQ ID NO: 81), LLAPSHRA (SEQ ID NO: 82), GPRSFG (SEQ ID NO: 83), GPRSFG (SEQ ID NO: 84), SARGPSRW (SEQ ID NO: 85), GGWHTGRN (SEQ ID NO: 86), HTGRSGAL (SEQ ID NO: 87), AARGPAIH (SEQ ID NO: 88), RGPAFNPM (SEQ ID NO: 89), SSRGPAYL (SEQ ID NO: 90), RGPATPIM (SEQ ID NO: 91), RGPA (SEQ ID NO: 92), GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 93), FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 94), SPLTGRSG (SEQ ID NO: 95), SAGFSLPA (SEQ ID NO: 96), LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 97), SGGPLGVR (SEQ ID NO: 98), PLGL (SEQ ID NO: 99) и SGRSDNI (SEQ ID NO: 100). В некоторых вариантах осуществления CM содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), SGRSDNI (SEQ ID NO: 100).) и ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68). В некоторых вариантах осуществления протеаза(ы) продуцируется(ются) опухолью в организме субъекта, например, протеаза(ы) продуцируется(ются) в более высоких количествах в

опухоли, чем в здоровых тканях субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъекта был диагностирован или идентифицирован как имеющий рак.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и CM1 непосредственно примыкают друг к другу в первой мономерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу в первой мономерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления CP2 и CM2 непосредственно примыкают друг к другу во второй мономерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления CM2 и DD2 непосредственно примыкают друг к другу во второй мономерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит CP1, непосредственно примыкающий к CM1, и CM1, непосредственно примыкающий к DD1, при этом CM1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 5-100. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит CP2, непосредственно примыкающий к CM2, и CM2, непосредственно примыкающий к DD2, при этом CM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 5-100. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит CP1, непосредственно примыкающий к CM1, и CM1, непосредственно примыкающий к DD1, при этом CM1 содержит последовательность, которая составляет не более 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит CP2, непосредственно примыкающий к CM2, и CM2, непосредственно примыкающий к DD2, при этом CM2 содержит последовательность, которая составляет не более 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления каждая из первой и второй мономерных конструкций имеют такую конфигурацию, что цитокин (CM1 и CM2 соответственно) непосредственно примыкает к расщепляемому фрагменту (CM1 и CM2 соответственно), который составляет не более 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислот в длину, и расщепляемый фрагмент непосредственно примыкает к домену димеризации (DD1 и DD2 соответственно), который представляет собой Fc-область IgG человека, при этом N-конец Fc-области представляет собой первый остаток цистеина в шарнирной области, считываемой в направлении от N к C (например, цистеин 226 IgG1 человека, с использованием EU-нумерации). В некоторых аспектах домен димеризации представляет собой Fc-область IgG, в которой делетированы верхние шарнирные остатки. Например, Fc представляет собой вариант, в котором делетированы N-концевые последовательности EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 516), ERK,

ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 517) или ESKYGPP (SEQ ID NO: 518).

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один линкер представляет собой линкер L1, расположенный между CP1 и CM1, и/или линкер L2, расположенный между CM1 и DD1. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один линкер представляет собой линкер L3, расположенный между CP2 и CM2, и/или линкер L4, расположенный между CM2 и DD2. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит линкер L1, а вторая мономерная конструкция содержит линкер L3. В некоторых вариантах осуществления L1 и L3 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит линкер L2, а вторая мономерная конструкция содержит линкер L4. В некоторых вариантах осуществления L2 и L4 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления каждый линкер имеет общую длину от 1 аминокислоты до приблизительно 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления каждый линкер имеет общую длину, составляющую по меньшей мере 5 аминокислот. Используемый в данном документе термин «линкер» относится к пептиду, аминокислотная последовательность которого не является субстратом для протеазы.

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер, при этом каждый линкер независимо выбран из группы, состоящей из GSSGSGGSGG (SEQ ID NO: 210); GGGS (SEQ ID NO: 2); GGGSGGGS (SEQ ID NO: 211); GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 212); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213); GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214); GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 215); GGGGS (SEQ ID NO: 216); GS; GGGGSGS (SEQ ID NO: 217); GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 218); GGS LDPKGGGS (SEQ ID NO: 219); PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 220); SKYGPCCPPCPAPEFLG (SEQ ID NO: 221); GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 222); GSTSGSGKSSEGGK (SEQ ID NO: 223); GSTSGSGKSSEGGSGSTKG (SEQ ID NO: 224); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 225); GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226); (GS)_n, (GGG)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 227), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 228), (GGGGGS)_n (SEQ ID NO: 216), где каждый n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере один; GGSG (SEQ ID NO: 229); GGSGG (SEQ ID NO: 230); GSGSG (SEQ ID NO: 231); GSGGG (SEQ ID NO: 232); GGGSG (SEQ ID NO: 233);

GSSSG (SEQ ID NO: 234); GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213); GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214); и GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность GGGS (SEQ ID NO: 2).

Используемый в данном документе термин «спейсер» относится к аминокислотному остатку или пептиду, включенному в свободный конец зрелой ACC, например, между сигнальным пептидом и N-концом зрелой ACC. В некоторых аспектах спейсер (или «заголовок») может содержать остатки глутамин (Q). В некоторых аспектах остатки в спейсере минимизируют действие аминопептидазы и/или экзопептидазы для предупреждения расщепления N-концевых аминокислот. Иллюстративные и неограничивающие спейсерные аминокислотные последовательности могут включать любую из следующих иллюстративных аминокислотных последовательностей: QGQSGS (SEQ ID NO: 504); GQSGS (SEQ ID NO: 505); QSGS (SEQ ID NO: 506); SGS; GS; S; QGQSGQG (SEQ ID NO: 507); GQSGQG (SEQ ID NO: 508); QSGQG (SEQ ID NO: 509); SGQG (SEQ ID NO: 510); GQG; QG; G; QGQSGQ (SEQ ID NO: 511); GQSGQ (SEQ ID NO: 512); QSGQ (SEQ ID NO: 513); QGQSG (SEQ ID NO: 514); QGQS (SEQ ID NO: 515); SGQ; GQ; и Q, или состоять из них. В некоторых вариантах осуществления спейсерные последовательности могут быть опущены.

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит в направлении от N- к С-концу CP1, CM1 и связана непосредственно или опосредованно с С-концом CM1, DD1. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит в направлении от С- к N-концу CP1, CM1 и связан непосредственно или опосредованно с N-концом CM1, DD1. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит в направлении от N- к С-концу CP2, CM2 и связан непосредственно или опосредованно с С-концом CM2, DD2. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит в направлении от С- к N-концу CP2, CM2 и связан непосредственно или опосредованно с CM2, DD2.

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит в направлении от N- к С-концу CP1, необязательный линкер, CM1, необязательный линкер и DD1, при этом DD1 представляет собой Fc-область IgG, при этом N-конец Fc-области представляет собой первый остаток цистеина в шарнирной области, прочитанный в направлении от N к С (например, цистеин 226 IgG1 или IgG4 человека, с использованием EU-нумерации), и при этом CM1 и любой(ые) линкер(ы),

расположенный(ые) между CP1 и N-концевым цистеином DD1, имеют общую длину не более 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислот, предпочтительно не более 10 аминокислот, особенно предпочтительно не более 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит в направлении от N- к С-концу CP2, необязательный линкер, CM2, необязательный линкер и DD2, при этом DD2 представляет собой Fc-область IgG, при этом N-конец Fc-области представляет собой первый остаток цистеина в шарнирной области, прочитанный в направлении от N к С (например, цистеин 226 IgG1 или IgG4 человека, с использованием EU-нумерации), и при этом CM2 и любой(ые) линкер(ы), расположенный(ые) между CP2 и N-концевым цистеином DD2, имеют общую длину не более 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислот, предпочтительно не более 10 аминокислот, особенно предпочтительно не более 7 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления ACC представляет собой гомодимер, в котором первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция идентичны и содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 313. В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция и вторая мономерная конструкция содержат аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 313. В некоторых вариантах осуществления каждая из первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции содержит в направлении от N- к С-концу SEQ ID NO:1; CM, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 100; и домен димеризации.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из указанной активности CP1 и/или CP2 представляет собой аффинность связывания (K_D) CP1 и/или CP2 в отношении его когнатного рецептора, как определено с использованием поверхностного плазмонного резонанса. Например, если CP1 или CP2 представляет собой интерферон, когнатным рецептором может быть рецептор интерферона-альфа/бета (IFNAR). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из активности CP1 и/или CP2 представляет собой уровень пролиферации клеток лимфомы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из указанной активности CP1 и/или CP2 представляет собой уровень активации пути JAK/STAT/ISGF3 в клетке лимфомы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность представляет собой уровень продуцирования секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP) в клетке лимфомы. В некоторых

вариантах осуществления АСС (до воздействия протеаз) характеризуется по меньшей мере 2-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 5-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 10-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 20-кратным, 50-кратным, 100-кратным, 200-кратным, 300-кратным, 400-кратным, 500-кратным, 600-кратным, 700-кратным, 800-кратным, 900-кратным, 1000-кратным, 1100-кратным, 1200-кратным, 1300-кратным, 1400-кратным, 1500-кратным, 1600-кратным, 1700-кратным, 1800-кратным, 1900-кратным, 2000-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 представляет собой активность CP1 и/или CP2 в АСС после воздействия на АСС протеазы(протеаз). В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень по меньшей мере одного из CP1 и/или CP2 представляет собой соответствующую активность CP1 и/или CP2 соответствующего зрелого цитокина дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия протеазы(протеаз), при этом продукт расщепления включает по меньшей мере одну из активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из активности из CP1 и/или CP2 представляет собой антипролиферативную активность. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень представляет собой значение EC50 зрелого цитокина дикого типа, и при этом соотношение EC50 (продукт расщепления) к EC50 (контрольный уровень дикого типа) составляет менее приблизительно 10, или менее приблизительно 9, или менее приблизительно 8, или менее приблизительно 7, или менее приблизительно 6, или менее приблизительно 5, или менее приблизительно 4, или менее приблизительно 3, или менее приблизительно 2, или менее приблизительно 1,5, или равно приблизительно 1. В некоторых вариантах осуществления EC50 продукта расщепления является примерно таким же, как EC50 зрелого цитокина дикого типа, демонстрируя, что после расщепления активность CP1 и/или CP2 полностью или почти полностью восстанавливается.

В данном документе представлены композиции, содержащие любую из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию. Также в данном документе представлены наборы, содержащие по меньшей мере одну дозу любой из композиций, описанных в данном документе.

В данном документе представлены способы лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из АСС, описанных в данном документе, или любой из композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект был идентифицирован или диагностирован как имеющий рак. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления рак представляет собой саркому Капоши, волосатоклеточный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз (CML), фолликулярную лимфому, почечно-клеточный рак (RCC), меланому, нейробластому, базально-клеточную карциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, колоректальный рак, кожную Т-клеточную лимфому, аденокарциному носоглотки, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), рак яичников, рак поджелудочной железы. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления рак представляет собой лимфому. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления лимфома представляет собой лимфому Беркитта.

В данном документе представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, который содержит CP1 и CM1 любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит любой из DD1, описанных в данном документе. В данном документе также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, который содержит CP2 и CM2 любой из АСС, описанных в данном документе. Когда мономеры являются идентичными, в настоящем изобретении представлена одна нуклеиновая кислота, кодирующая мономер, который димеризуется с образованием АСС. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит любой из DD2, описанных в данном документе. Также в данном документе предусмотрены векторы, содержащие любую из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии. Также в данном документе представлены клетки, содержащие любую из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, или любой из векторов, описанных в данном документе.

В данном документе представлены пары нуклеиновых кислот, которые совместно кодируют полипептид, содержащий CP1 и CM1 первой мономерной конструкции, и полипептид, который содержит CP2 и CM2 второй мономерной конструкции любой из АСС, описанных в данном документе. Также в данном документе представлены пары векторов, которые совместно содержат любую из пары нуклеиновых кислот, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления пара векторов представляет собой пару векторов экспрессии. Также в данном документе представлены клетки, содержащие любую из пары нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, или любой из пары векторов, описанных в данном документе. В других вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен вектор, содержащий пару векторов.

В данном документе представлены способы получения АСС, включающие культивирование любой из клеток, описанных в данном документе, в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для получения АСС; и извлечение АСС из клетки или жидкой культуральной среды. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение АСС, извлеченной из клетки или жидкой культуральной среды. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение выделенной АСС в состав фармацевтической композиции.

В данном документе представлены АСС, полученные любым из способов, описанных в данном документе. В данном документе также представлены композиции, содержащие любую из АСС, описанных в данном документе. Также в данном документе представлены композиции любой из композиций, описанных в данном документе, при этом композиция представляет собой фармацевтическую композицию. Также в данном документе представлены наборы, содержащие по меньшей мере одну дозу любой из композиций, описанных в данном документе.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же самое значение, как обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой настоящее изобретение принадлежит. Методы и материалы, используемые в настоящем изобретении, описаны в настоящем изобретении; также могут быть использованы другие подходящие методы и материалы, известные в данной области техники. Материалы, методы и примеры являются лишь иллюстративными и не должны рассматриваться как ограничительные. Все публикации, патентные заявки, патенты, последовательности, номера доступа в базах данных и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены посредством

ссылки во всей своей полноте. В случае возникновения противоречий настоящее описание, включая определения, имеет преимущественную силу.

Другие особенности и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания изобретения и графических материалов, а также из формулы изобретения.

Формы единственного числа относятся к одному или нескольким (т.е. по меньшей мере к одному) определяемым грамматическим объектам. Например, «клетка» включает одну или несколько клеток.

Используемые в данном документе термины «приблизительно» и «примерно», когда они применяются для модификации количества, указанного в числовом значении или диапазоне, указывают, что числовое значение, а также допустимые отклонения от значения, известного специалисту в данной области техники, например, $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, или $\pm 5\%$ находятся в пределах предполагаемого значения приведенной величины.

Концентрации, количества и другие числовые данные могут быть выражены или представлены в данном документе в формате диапазона. Следует понимать, что такой формат диапазона используется просто для удобства и краткости, и, следовательно, его следует интерпретировать гибко, чтобы включать не только числовые значения, явно указанные как пределы диапазона, но также включать все отдельные числовые значения или поддиапазоны, входящие в этот диапазон, как если бы каждое числовое значение и поддиапазоны явно перечислялись. В качестве иллюстрации числовой диапазон «приблизительно от 0,01 до 2,0» следует интерпретировать как включающий не только явно указанные значения от приблизительно 0,01 до приблизительно 2,0, но также включающие отдельные значения и поддиапазоны в пределах указанного диапазона. Таким образом, в этот числовой диапазон включены отдельные значения, такие как 0,5, 0,7 и 1,5, и поддиапазоны, такие как от 0,5 до 1,7, от 0,7 до 1,5 и от 1,0 до 1,5 и т.д. Кроме того, такая интерпретация должна применяться независимо от широты диапазона или описываемых характеристик. Кроме того, следует отметить, что все проценты указаны по массе, если не указано иное.

При понимании объема настоящего изобретения термины «включающий» или «содержащий» и их производные, как они используются в данном документе, предназначены для открытых терминов, которые определяют наличие заявленных признаков, элементов, компонентов, групп, целых чисел и/или этап, но не исключают наличие других неуказанных признаков, элементов, компонентов, групп, целых чисел и/или этапов. Вышеизложенное также относится к словам, имеющим аналогичные

значения, таким как термины «включающий», «имеющий» и их производные. Термин «состоящий» и его производные, используемые в данном документе, предназначены для использования в качестве закрытых терминов, которые указывают наличие указанных признаков, элементов, компонентов, групп, целых чисел и/или этапов, но исключают наличие других неуказанных функций, элементов, компонентов, групп, целых чисел и/или этапов. Термин «состоящий по сути из», как используется в данном документе, предназначен для указания наличия указанных признаков, элементов, компонентов, групп, целых чисел и/или этапов, а также тех, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики признаков, элементов, компонентов, групп, целых чисел и/или этапов. Понятно, что ссылка на любой из этих переходных терминов (т.е. «содержащий», «состоящий» или «состоящий по сути») обеспечивает прямую поддержку замены любым другим переходным термином, который конкретно не используется. Например, изменение термина «состоящий» на «состоящий по сути из» или «состоящий из» нашло бы прямую поддержку благодаря этому определению для любых элементов, раскрытых в настоящем изобретении. На основании этого определения любой элемент, раскрытый в данном документе или включенный посредством ссылки, может быть включен или исключен из заявленного изобретения.

Как используется в данном документе, множество соединений, элементов или этапов могут быть представлены в общем перечне для удобства. Однако эти перечни следует толковать так, как будто каждый элемент перечня индивидуально идентифицируется как отдельный и уникальный элемент. Таким образом, ни один отдельный член такого перечня не должен толковаться как эквивалентный *де-факто* любому другому члену того же перечня исключительно на основании их представления в общей группе без указаний на обратное.

Кроме того, некоторые молекулы, конструкции, композиции, элементы, фрагменты, вспомогательные вещества, нарушения, состояния, свойства, этапы и т.п. могут обсуждаться в контексте одного конкретного варианта осуществления или аспекта или в отдельном параграфе или разделе настоящего описания. Понятно, что это делается только для удобства и краткости, и любое такое раскрытие в равной степени применимо и предназначено для объединения с любыми другими вариантами осуществления или аспектами, обнаруженными где-либо в настоящем изобретении и формуле изобретения, которые вместе образуют заявку и заявленное изобретение на момент публикации. Например, список конструкций, молекул, этапов способа, наборов или композиций, описанных в отношении конструкции, композиции или способа,

предназначен и находит прямую поддержку для вариантов осуществления, связанных с конструкциями, композициями, препаратами и способами, описанными в любой другой части настоящего изобретения, даже если эти этапы способа, активные средства, наборы или композиции не перечислены повторно в контексте или разделе этого варианта осуществления или аспекта.

Если не указано иное, «последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и, таким образом, кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность.

Термин «расположенный на N-конце» применительно к положению первого домена или последовательности относительно второго домена или последовательности в первичной аминокислотной последовательности полипептида означает, что первый домен или последовательность расположены ближе к N-концу первичной аминокислотной последовательности полипептида, чем второй домен или последовательность. В некоторых вариантах осуществления могут присутствовать дополнительные последовательности и/или домены между первым доменом или последовательностью и вторым доменом или последовательностью.

Термин «расположенный на C-конце» применительно к положению первого домена или последовательности относительно второго домена или последовательности в первичной аминокислотной последовательности полипептида означает, что первый домен или последовательность расположены ближе к C-концу первичной аминокислотной последовательности полипептида, чем второй домен или последовательность. В некоторых вариантах осуществления могут присутствовать дополнительные последовательности и/или домены между первым доменом или последовательностью и вторым доменом или последовательностью.

Термин «экзогенный» относится к любому материалу, введенному из клетки, ткани или организма или происходящему из них, который не продуцируется или не происходит из той же клетки, ткани или организма, в который он вводится.

Термин «трансдуцированный», «трансфицированный» или «трансформированный» относится к процессу, посредством которого экзогенная нуклеиновая кислота вводится или переносится в клетку. «Трансдуцированная», «трансфицированная» или «трансформированная» клетка (например, клетка млекопитающего) представляет собой клетку, которая была трансдуцирована, трансфицирована или трансформирована экзогенной нуклеиновой кислотой (например,

вектором), которая включает экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую любую из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе.

Термин «нуклеиновая кислота» относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) или рибонуклеиновой кислоте (РНК) или их комбинации либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Если не указано иное, этот термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, обладающие такими же связывающими свойствами, как и эталонные нуклеотиды. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно включает комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В некоторых вариантах осуществления любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

Модификации могут быть введены в нуклеотидную последовательность с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и мутагенез, опосредованный полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с кислыми боковыми цепями (например, аспартат и глутамат), аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин и гистидин), неполярные аминокислоты (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин и триптофан), незаряженные полярные аминокислоты (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин и тирозин), гидрофильные аминокислоты (например, аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин), гидрофобные аминокислоты (например, аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин). Другие семейства аминокислот включают алифатические гидроксикаминокислоты (например, серин и треонин), семейство амидов (например, аспарагин и глутамин), семейство альфатических кислот (например, аланин, валин, лейцин и изолейцин), семейство ароматических кислот (например, фенилаланин, триптофан и тирозин).

Используемая в данном документе фраза «специфически связывается» или

«иммунореагирует с» означает, что комплекс активируемого антигенсвязывающего белка реагирует с одной или несколькими антигенными детерминантами требуемого антигена-мишени и не реагирует с другими полипептидами или связывается с гораздо более низкой аффинностью, например, приблизительно или более 10^{-6} М.

Термин «лечение» относится к ослаблению по меньшей мере одного симптома нарушения. В некоторых вариантах осуществления нарушение, которое подлежит лечению, представляет собой рак, и в отношении которого требуется нормализация по меньшей мере одного симптома рака.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фигуре 1А** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерные конструкции, которые связываются друг с другом либо ковалентно, либо нековалентно посредством первого и второго доменов димеризации DD1 **140** и DD2 **190** соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый зрелый цитокиновый белок CP1 **100**, первый необязательный линкер **110**, первый расщепляемый фрагмент CM1 **120**, второй необязательный линкер **130** и первый домен димеризации DD1 **140**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй зрелый цитокиновый белок CP2 **150**, третий необязательный линкер **160**, второй расщепляемый фрагмент CM2 **170**, четвертый необязательный линкер **180** и второй домен димеризации DD2 **190**.

На **фигуре 1В** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерные конструкции, которые связываются друг с другом либо ковалентно, либо нековалентно посредством первого и второго доменов димеризации DD1 **200** и DD2 **250** соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый домен димеризации DD1 **200**, второй необязательный линкер **210**, первый расщепляемый фрагмент CM1 **220**, первый необязательный линкер **230** и первый зрелый цитокиновый белок CP1 **240**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй домен димеризации DD2 **250**, четвертый необязательный линкер **260**, второй расщепляемый фрагмент CM2 **270**, третий необязательный линкер **280** и второй зрелый цитокиновый белок CP2 **290**.

На **фигуре 2А** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерные конструкции, которые связываются друг с другом ковалентно посредством первого и второго доменов димеризации DD1 **340** и DD2 **390** соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый зрелый цитокиновый белок CP1 **300**, первый

необязательный линкер **310**, первый расщепляемый фрагмент CM1 **320**, второй необязательный линкер **330** и первый домен димеризации DD1 **340**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй зрелый цитокиновый белок CP2 **350**, третий необязательный линкер **360**, второй расщепляемый фрагмент CM2 **370**, четвертый необязательный линкер **380** и второй домен димеризации DD2 **390**.

На **фигуре 2В** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерные конструкции, которые связываются друг с другом ковалентно посредством первого и второго доменов димеризации DD1 **400** и DD2 **450** соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый домен димеризации DD1 **400**, второй необязательный линкер **410**, первый расщепляемый фрагмент CM1 **420**, первый необязательный линкер **430** и первый зрелый цитокиновый белок CP1 **440**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй домен димеризации DD2 **450**, четвертый необязательный линкер **460**, второй расщепляемый фрагмент CM2 **470**, третий необязательный линкер **480** и второй зрелый цитокиновый белок CP2 **490**.

На **фигуре 3** представлена аминокислотная последовательность иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции IFN- α 2b-1204dL-hIgG4 (SEQ ID NO:309), при этом первая и вторая мономерные конструкции имеют идентичную аминокислотную последовательность. От N-конца к С-концу аминокислотная последовательность первой и второй мономерных конструкций кодирует сигнальный пептид мыши (текст выделен курсивом, не выделен жирным шрифтом); зрелый интерферон- α 2b человека (подчеркнутый текст); расщепляемый фрагмент 1204dL (текст выделен жирным шрифтом); линкер (текст курсивом и жирным шрифтом); и Fc-домен IgG4 человека (текст не выделен курсивом, жирным шрифтом или подчеркиванием).

На **фигуре 4** представлена аминокислотная последовательность иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции IFN- α 2b-1490DNI-hIgG4 (SEQ ID NO:311), при этом первая и вторая мономерные конструкции имеют идентичную аминокислотную последовательность. От N-конца к С-концу аминокислотная последовательность кодирует сигнальный пептид мыши (текст выделен курсивом, не выделен жирным шрифтом); зрелый интерферон- α 2b человека (подчеркнутый текст); расщепляемый фрагмент 1490DNI (текст выделен жирным шрифтом, не выделен курсивом); линкер (текст курсивом и жирным шрифтом); и Fc-домен IgG4 человека (текст не выделен курсивом, жирным шрифтом или подчеркиванием).

подчеркиванием).

На фигуре 5 изображена реакция расщепления активируемой цитокиновой конструкции IFN α -2b-hIgG4 Fc (либо с расщепляемым фрагментом 1204dL, либо с расщепляемым фрагментом 1490) и протеазы (либо uPA, либо MT-SP1), которая создает мономерный зрелый IFN α -2b.

На фигуре 6 представлено изображение геля, нагруженного: (1) ACC с расщепляемым фрагментом 1204 (1204); (2) продуктом протеазы в виде сериновой протеазы 1 мембранного типа (MT-SP1) и ACC IFN α -2b-hIgG4 Fc с расщепляемым фрагментом 1204 (1204 MT-SP1); (3) продуктом ACC IFN α -2b-hIgG4 Fc с расщепляемым фрагментом 1204 и протеазой uPA (1204 uPA); (4) ACC IFN α -2b-hIgG4 Fc с расщепляемым фрагментом 1204, слитым с линкером из 5 аминокислот (1204 + 1); (5) продуктом IFN α -2b-hIgG4 Fc 1204 + 1 и MT-SP1 (1204+1 MT-SP1); (6) ACC IFN α -2b-hIgG4 Fc с расщепляемым фрагментом 1490; (7) продуктом MT-SP1 и ACC IFN α -2b-hIgG4 Fc с расщепляемым фрагментом 1490; продуктом uPA и ACC IFN α -2b-hIgG4 Fc с расщепляемым фрагментом 1490 (1490 uPA).

На фигуре 7 представлены результаты репортерного анализа на основе клеток HEK293 для оценки активности интерферона- α 2b Sylatron[®] (пегинтерферона альфа-2b) и различных слитых продуктов интерферона α -2b (IFNa2b): IgG4 человека, слитого на N-конце с IFNa2b (IFNa2b NhG4); IgG4 человека, слитого на N-конце с IFNa2b посредством линкера из пяти аминокислот (IFNa2b 5AA NhG4); активируемой цитокиновой конструкции IFN- α 2b-1204dL-hIgG4 (IFNa2b 1204DNIdL NhG4); активируемой цитокиновой конструкции, которая включает те же компоненты, что и IFN- α 2b-1204dL-hIgG4, но также имеет линкер из 5 аминокислот, расположенный между зрелым цитокиновым белковым компонентом и расщепляемым фрагментом (IFNa2b 5AA 1204DNIdL NhG4); и активируемой цитокиновой конструкции IFN- α 2b-1490DNI-hIgG4 (IFNa2b 1490DNI NhG4).

На фигуре 8А изображен эффект длины гибкого линкера в слитом продукте на основе интерферона- α 2b-Fc на EC50, как определено с помощью репортерного анализа на основе клеток HEK293. **На фигуре 8В** изображен эффект длины связывающей области (LR) в слитом продукте на основе интерферона- α 2b-Fc на EC50, как определено с помощью репортерного анализа на основе клеток HEK293.

На фигуре 9 представлены результаты анализа апоптоза клеток Daudi для определения антипролиферативной активности Sylatron[®] и различных слитых продуктов на основе IFNa2b: IgG4 человека, слитого на N-конце с IFNa2b (IFNa2b

NhG4); IgG4 человека, слитого на N-конце с IFNa2b посредством линкера из пяти аминокислот (IFNa2b 5AA NhG4); активируемой цитокиновой конструкции IFN- α 2b-1204dL-hIgG4 (IFNa2b 1204DNIIdL NhG4); активируемой цитокиновой конструкции, которая включает те же компоненты, что и IFN- α 2b-1204dL-hIgG4, но также имеет линкер из 5 аминокислот, расположенный между зрелым цитокиновым белковым компонентом и расщепляемым фрагментом (IFNa2b 5AA 1204DNIIdL NhG4); и активируемой цитокиновой конструкции IFN- α 2b-1490DNI-hIgG4 (IFNa2b 1490DNI NhG4).

На фигуре 10А изображен эффект длины линкера в слитом продукте на основе интерферона- α 2b-Fc на EC50, как определено в анализе апоптоза клеток Daudi. **На фигуре 10В** изображен эффект длины связывающей области (LR) в слитом продукте на основе интерферона- α 2b-Fc на EC50, как определено с помощью анализа апоптоза клеток Daudi.

На фигуре 11 представлены результаты анализа на основе клеток лимфомы Daudi для измерения антипролиферативной активности ACC (IFNa2b 1204DNIIdL NhG4); обработанной протеазой ACC (IFNa2b 1204DNIIdL NhG4 + uPA); и рекомбинантного исходного цитокина (IFNa2b). Результаты показали, что после обработки ACC протеазой активность цитокина в ACC может быть восстановлена до уровня, сопоставимого с рекомбинантным исходным цитокином.

На фигуре 12 изображены результаты репортерного анализа на основе клеток НЕК293 для оценки активности ACC (IFNa2b 1204DNIIdL NhG4); обработанной протеазой (активированной) ACC (IFNa-2b 1204DNIIdL NhG4 + uPA); Sylatron®; и рекомбинантного исходного цитокина (IFNa2b). Результаты показали, что после обработки ACC протеазой активность цитокина в ACC может быть восстановлена до уровня, сопоставимого с рекомбинантным исходным цитокином.

На фигуре 13 изображены результаты анализа на основе клеток лимфомы Daudi для измерения антипролиферационной активности (вверху) и результаты репортерного анализа на основе клеток НЕК293 для измерения активности (внизу) ACC (ProC440), обработанной протеазой ACC (ProC440 + uPA) и IFNa2b стволовых клеток. Результаты показали, что активность была снижена в 1000 раз за счет создания структуры ACC по настоящему изобретению, и после обработки ACC протеазой активность цитокина в ACC была восстановлена до уровня, сопоставимого с рекомбинантным исходным цитокином.

На фигуре 14А изображена структура ProC440, и показано, что расщепление

uPa в предполагаемом сайте в СМ было подтверждено с помощью масс-спектрометрического анализа. Помимо чувствительности к активации uPa, ProC440 расщепляется MMP4. На **фигуре 14В** изображен анализ на основе масс-спектрометрии, идентифицировавший сайт расщепления MMP14 на С-конце IFNa (в L161) возле расщепляемого фрагмента. Активация протеазы с помощью MMP14 восстанавливала активность до уровня, сопоставимого с активностью рекомбинантного цитокина.

На **фигуре 15** изображены структуры ProC440 и ProC657 (N IFNa2b 0AA 1204DNIIdL 0AA IgG4 KiHSS). Активность АСС ProC440 и ProC657, обработанных протеазой АСС (ProC440 + uPA), и IFNa2b стволовых клеток тестировали с использованием восприимчивых к IFN клеток HEK293. Результаты показали, что активность ProC657 была снижена по сравнению с IFNa-2b стволовых клеток или активированной uPa ProC440, но повышена по сравнению с ProC440.

На **фигуре 16 (вверху)** изображены антипролиферативные эффекты АСС ProC440 *in vivo* с использованием модели ксенотрансплантата опухоли из клеток Daudi. АСС ProC440 индуцировала полную регрессию опухоли уже в дозе 0,1 мг/кг и замедляла рост опухоли в дозе 0,02 мг/кг. На **фигуре 16 (внизу)** изображены антипролиферативные эффекты Sylatron® *in vivo* с использованием модели ксенотрансплантата опухоли клеток Daudi.

На **фигуре 17А** изображена структура ProC286 и активность ProC286 по сравнению с активностью Sylatron® в анализе апоптоза клеток Daudi. ProC286 и Sylatron® продемонстрировали аналогичные уровни активности, что указывает на то, что ProC286 можно использовать в качестве суррогатного контроля Sylatron® для оценки переносимости IFNa-2b в исследовании на хомяках. На **фигуре 17В** изображена структура ProC291 и активность ProC291 по сравнению с активностью Sylatron® в анализе апоптоза клеток Daudi. ProC291 продемонстрировала значительно более низкую активность по сравнению с Sylatron® и ProC286.

На **фигуре 18** показана удельная активность IFNa-con (рекомбинантный интерферон альфа, не встречающийся в природе интерферон типа I). ProC440+uPA, PEG-IFNa2b (Sylatron) и ProC440 и ожидаемые токсические дозы в исследовании с повышением дозы *in vivo*, например, при возрастающих дозах 0,08, 0,4, 2, 10, 15 мг/кг («мг/кг»).

На **фигуре 19** показана структура универсального интерферона АСС ProC859 (вверху), антипролиферативные эффекты АСС ProC859 в анализе клеток меланомы мыши В16 и активность АСС ProC859 в анализе IFN-чувствительных HEK293.

На **фигуре 20A** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерные конструкции, которые связываются друг с другом ковалентно посредством первого и второго доменов димеризации **DD1 540** и **DD2 590** соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый зрелый цитокиновый белок **CP1 500**, первый необязательный линкер **510**, первый расщепляемый фрагмент **CM1 520**, второй необязательный линкер **530** и первый домен димеризации **DD1 540**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй зрелый цитокиновый белок **CP2 550**, третий необязательный линкер **560** и второй домен димеризации **DD2 590**.

На **фигуре 20B** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерные конструкции, которые связываются друг с другом ковалентно посредством первого и второго доменов димеризации **DD1 600** и **DD2 650**, соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый домен димеризации **DD1 600**, первый необязательный линкер **630** и первый зрелый цитокиновый белок **CP1 640**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй домен димеризации **DD2 650**, второй необязательный линкер **660**, расщепляемый фрагмент **CM 670**, третий необязательный линкер **680** и второй зрелый цитокиновый белок **CP2 690**.

На **фигуре 21A** представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерные конструкции, которые связываются друг с другом ковалентно посредством первого и второго доменов димеризации **DD1 740** и **DD2 790** соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый зрелый цитокиновый белок **CP 700**, первый необязательный линкер **710**, первый расщепляемый фрагмент **CM1 720**, второй необязательный линкер **730** и первый домен димеризации **DD1 740**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу полипептид или белок, который не имеет цитокиновой активностью **780**, и второй домен димеризации **DD2 790**. Полипептид или белок, которые не имеют цитокиновой активности **780**, может, например, представлять собой усеченный цитокиновый белок, который не имеет цитокиновой активности, мутантный цитокиновый белок, который не имеет цитокиновой активности, последовательность отрезка или полипептидную последовательность, которая связывается с высокой аффинностью с **CP 700** и снижает цитокиновую активность второго фрагмента по сравнению с контрольным уровнем второго фрагмента. **DD1 740**

и DD2 790 могут быть одинаковыми или разными.

На фигуре 21В представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерные конструкции, которые связываются друг с другом ковалентно посредством первого и второго доменов димеризации DD1 800 и DD2 850 соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу первый домен димеризации DD1 800 и полипептид или белок, который не имеет цитокиновой активности 830. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй домен димеризации DD2 850, первый необязательный линкер 860, расщепляемый фрагмент CM 870, второй необязательный линкер 880 и зрелый цитокиновый белок CP 890. Полипептид или белок, которые не имеют цитокиновой активности 830, может, например, представлять собой усеченный цитокиновый белок, который не имеет цитокиновой активности, мутантный цитокиновый белок, который не имеет цитокиновой активности, последовательность отрезка или полипептидную последовательность, которая связывается с высокой аффинностью с CP 700 и снижает цитокиновую активность второго фрагмента по сравнению с контрольным уровнем второго фрагмента. DD1 800 и DD2 850 могут быть одинаковыми или разными.

На фигуре 22 изображена потеря массы животного при введении 2 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг контрольного hIgG4, ProC286 или ProC440 в течение периодов обработки у сирийских золотых хомячков.

На фигуре 23 изображены клинические результаты биохимического анализа (щелочная фосфатаза, аланинтрансаминаза и аспаратаминотрансфераза) у сирийских золотых хомячков, которым вводили 2 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг контрольного hIgG4, ProC286 или ProC440.

На фигуре 24 изображены результаты гематологического анализа (количество ретикулоцитов, нейтрофилов и лейкоцитов (WBC)) у сирийских золотых хомячков, которым вводили 2 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг контрольного hIgG4, ProC286 или ProC440.

На фигуре 25 схематически изображен вариант осуществления АСС, обозначающий его связывающую область (LR).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе предусмотрены активируемые цитокиновые конструкции (АСС), которые проявляют сниженный уровень активности по меньшей мере одного соответствующего цитокина, но которые после воздействия условий активации

приводят к образованию цитокинового продукта, имеющего в значительной степени восстановленную активность. Активируемые цитокиновые конструкции по настоящему изобретению могут быть разработаны для селективной активации при воздействии на пораженную ткань, а не на нормальную ткань. Таким образом, эти соединения потенциально могут приносить пользу терапии на основе цитокинов с потенциально меньшей токсичностью, ассоциированной с некоторыми средствами терапии на основе цитокинов.

Также в данном документе представлены соответствующие промежуточные соединения, композиции, наборы, нуклеиновые кислоты и рекомбинантные клетки, а также соответствующие способы, включая способы применения и способы получения любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что АСС, имеющие специфические элементы и структурные ориентации, описанные в данном документе, потенциально эффективны для повышения безопасности и терапевтического индекса цитокинов при терапии, в частности, при лечении различных видов рака. Хотя цитокины являются регуляторами врожденной и адаптивной иммунной системы и имеют широкую противоопухолевую активность в доклинических моделях, их клинический успех был ограничен системной токсичностью и слабым системным воздействием на ткани-мишени. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что АСС, имеющие специфические элементы и структурные ориентации, описанные в данном документе, по-видимому, снижают системную токсичность, ассоциированную с цитокиновыми терапевтическими средствами, и улучшают нацеливание и воздействие на мишени. Таким образом, в настоящем изобретении представлен способ снижения опосредованного мишенью распределения лекарственного средства (TMDD) в виде цитокиновых терапевтических средств путем введения субъекту АСС, имеющих определенные элементы и структурные ориентации, описанные в данном документе. Таким образом, настоящее изобретение решает проблему секвестрации значительной части введенной дозы цитокина нормальными тканями, что является проблемой, которая ограничивает долю дозы, доступной в системном кровотоке, для достижения тканей-мишеней, например, раковой ткани, в традиционных средствах терапии на основе цитокинов. Настоящая цитокиновая конструкция локализует связывание мишени с опухолевыми тканями, за счет чего сохраняется эффективность, снижаются побочные эффекты, открываются возможности для новых мишеней, улучшается терапевтическое окно для проверенных мишеней,

создается терапевтическое окно для не поддающихся лечению мишеней и обеспечивается несколько модальностей связывания. Настоящее изобретение обеспечивает безопасную и эффективную системную доставку, за счет чего устраняется дозозависимая токсичность обычных системных средств терапии на основе цитокинов, а также устраняется необходимость внутриопухолевой инъекции. В настоящем изобретении представлены средства для придания локализованной противовирусной активности, иммуномодулирующей активности, антипролиферативной активности и проапоптотической активности. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что димеризация первой и второй мономерных конструкций обеспечивает значительное снижение активности цитокинов, в частности, более сильное снижение, чем когда один цитокин присоединен к домену димеризации. См. Фиг. 15.

Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что степень снижения цитокиновой активности можно регулировать путем изменения длины гибкого линкера или длины связывающей области. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что снижение цитокиновой активности примерно в 1000 раз или более может быть достигнуто путем присоединения цитокина посредством короткой последовательности, расщепляемой протеазой, к стерически ограниченному домену димеризации (такому как Fc-домен IgG человека, который усечен в первом цистеине в шарнирной области, например, Cys226, пронумерованном с использованием EU-нумерации). Неожиданным образом расщепление протеазой происходит, несмотря на стерические ограничения, и полная цитокиновая активность восстанавливается при отщеплении цитокина от домена димеризации.

Предварительное заявка США заявителя № 63/008542, поданная 10 апреля 2020 г., в которой описываются некоторые активируемые цитокиновые конструкции, включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Активируемые цитокиновые конструкции

Активируемые цитокиновые конструкции по настоящему изобретению представляют собой димерные комплексы, содержащие первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию. Димеризация мономерных компонентов облегчается парой доменов димеризации. В одном аспекте каждая мономерная конструкция содержит цитокиновый белок, расщепляемый фрагмент и домен димеризации (DD). В одном аспекте одна мономерная конструкция включает цитокиновый белок, расщепляемый фрагмент и DD, тогда как другая мономерная

конструкция включает цитокиновый белок и DD, но не расщепляемый фрагмент. В одном аспекте одна мономерная конструкция содержит цитокиновый белок, расщепляемый фрагмент и DD, тогда как другая мономерная конструкция содержит белок или пептид, который не обладает цитокиновой активностью, и DD, но не расщепляемый фрагмент. В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении представлена активируемая цитокиновая конструкция (ACC), которая содержит первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, где:

(a) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый цитокиновый белок (CP1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1),

при этом CM1 расположен между CP1 и DD1; и

(b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый цитокиновый белок (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2),

при этом CM2 расположен между CP2 и DD2;

при этом DD1 и DD2 связываются друг с другом, за счет чего образуется димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и

при этом ACC характеризуется сниженным уровнем из по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем из по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2.

Термин «активируемый», когда он используется в отношении цитокиновой конструкции, относится к цитокиновой конструкции, которая проявляет первый уровень одной или нескольких активностей, после чего воздействие условий, вызывающих расщепление одного или обоих расщепляемых фрагментов, приводит к образованию цитокиновой конструкции, которая проявляет второй уровень одной или нескольких активностей, при этом второй уровень активности является более высоким, чем первый уровень активности. Неограничивающие примеры видов активности включают любую из иллюстративных видов активности цитокина, описанных в данном документе или известных в данной области техники.

Термин «зрелый цитокиновый белок» относится в данном документе к цитокиновому белку, у которого отсутствует сигнальная последовательность. Цитокиновый белок (CP) может представлять собой зрелый цитокиновый белок или цитокиновый белок с сигнальным пептидом. Таким образом, в некоторых аспектах ACC по настоящему изобретению могут включать последовательность зрелого

цитокинового белка. В некоторых аспектах АСС по настоящему изобретению могут содержать последовательность зрелого цитокинового белка и, кроме того, сигнальную последовательность. В некоторых аспектах АСС по настоящему изобретению могут содержать последовательности, раскрытые в данном документе, содержащие или не содержащие сигнальные последовательности, указанные в данном документе.

Термины «расщепляемый фрагмент» и «СМ» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения пептида, аминокислотная последовательность которого содержит субстрат для специфичной в отношении последовательности протеазы. Расщепляемые фрагменты, которые являются подходящими для применения в качестве СМ1 и/или СМ2 включают любые субстраты протеаз, известные в данной области техники. Иллюстративные расщепляемые фрагменты более подробно описаны ниже.

Термины «домен димеризации» и «DD» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения одного члена пары доменов димеризации, при этом каждый член пары способен связываться с другим посредством одного или нескольких ковалентных или нековалентных взаимодействий. Первый DD и второй DD могут быть одинаковыми или разными. Иллюстративные DD, подходящие для применения в качестве DD1 и/или DD2, более подробно описаны ниже.

Используемый в данном документе полипептид, такой как цитокин или Fc-домен, может представлять собой полипептид дикого типа (например, существующий в природе полипептид) или вариант полипептида дикого типа. Вариант может представлять собой полипептид, модифицированный заменой, вставкой, делецией и/или добавлением одной или нескольких аминокислот полипептида дикого типа при условии, что вариант сохраняет основную функцию или активность полипептида дикого типа. В некоторых примерах вариант может иметь измененную (например, повышенную или сниженную) функцию или активность по сравнению с полипептидом дикого типа. В некоторых аспектах вариант может представлять собой функциональный фрагмент полипептида дикого типа. Термин «функциональный фрагмент» означает, что последовательность полипептида (например, цитокина) может содержать меньшее количество аминокислот, чем полноразмерная полипептидная последовательность, но достаточную длину полипептидной цепи для придания активности (например, цитокиновой активности).

Первая и вторая мономерные конструкции могут дополнительно содержать дополнительные элементы, такие как, например, один или несколько линкеров и т.п.

Дополнительные элементы описаны ниже более подробно. Организация компонентов CP, CM и DD в каждой из первой и второй мономерных конструкций может быть организована в одном и том же порядке в каждой мономерной конструкции. Компоненты CP1, CM1 и DD1 могут быть одинаковыми или разными по сравнению с соответствующими CP2, CM2 и DD2 с точки зрения, например, молекулярной массы, размера, аминокислотной последовательности компонентов CP и CM (и компонентов DD в вариантах осуществления, где компоненты DD представляют собой полипептиды) и т.п. Таким образом, полученный димер может иметь симметричные или асимметричные компоненты мономерной конструкции.

В некоторых вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит от N- до C-конца компонентов CP и CM, CP1 и CM1, и, связана непосредственно или опосредованно (посредством линкера) с C-концом CM1, DD1. В других вариантах осуществления первая мономерная конструкция содержит от C- до N-конца компонентов CP и CM, CP1, CM1, и связана непосредственно или опосредованно (посредством линкера) с N-концом CM1, DD1. В некоторых вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит от N- к C-концу компонентов CP и CM, CP2, CM2 и, связана непосредственно или опосредованно (посредством линкера), с C-концом CM2, DD2. В других вариантах осуществления вторая мономерная конструкция содержит C- до N-конца компоненты CP и CM, CP2 и CM2, и, связана непосредственно или опосредованно (посредством линкера) с N-концом CM2, DD2.

В некоторых вариантах осуществления первая и вторая мономерные конструкции ориентированы таким образом, что компоненты в каждом члене димера расположены в одном и том же порядке от N-конца к C-концу компонентов CP и CM. Схема иллюстративной АСС представлена на фигуре 1А. Со ссылкой на фигуру 1А, АСС содержит от N-конца к C-концу компонентов CP и CM: (1) первую мономерную конструкцию, имеющую CP1 100; CM1 120, расположенный на C-конце относительно CP1 100; необязательный линкер 110, который, если он присутствует, расположен между C-концом CP1 100 и N-концом CM1 120; DD1 140; и необязательный линкер 130, который, если он присутствует, расположен между C-концом CM1 120; и DD1 140; (2) вторую мономерную конструкцию, имеющую CP2 150; CM2 170, который расположен на C-конце относительно CP2 150; необязательный линкер 160, который, если он присутствует, расположен между C-концом CP2 150 и N-концом CM2 170; DD2 190; и необязательный линкер 180, который, если он присутствует, расположен между C-концом CM2 170 и DD2 190; и (3) одну или несколько ковалентных или нековалентных

связей ($\leftrightarrow$).

Схема дополнительной иллюстративной АСС с ее компонентами, расположенными в обратной ориентации АСС, представлена на фигуре 1В. Со ссылкой на фигуру 1В, АСС содержит от N-конца к С-концу компоненты СР и СМ: (1) первую мономерную конструкцию, имеющую DD1 **200**; CM1 **220**; необязательный линкер **210**, который, если он присутствует, расположен между DD1 **200** и N-концом CM1 **220**; CP1 **240**, расположенный на С-конце относительно CM1 **220**; и необязательный линкер **230**, который, если он присутствует, расположен между С-концом CM1 **220** и N-концом CP1 **240**; (2) вторую мономерную конструкцию, имеющую DD2 **250**; CM2 **270**; необязательный линкер **260**, который, если он присутствует, расположен между DD2 **250** и N-концом CM2 **270**; CP2 **290**, расположенный на С-конце относительно CM2 **270**; и необязательный линкер **280**, который, если он присутствует, расположен между С-концом CM2 **290** и N-концом CP2 **290**; и (3) одну или несколько ковалентных или нековалентных связей ($\leftrightarrow$).

На фигуре 2А представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерные конструкции, которые связываются друг с другом ковалентно посредством первого и второго доменов димеризации DD1 **340** и DD2 **390** соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу компонентов СР и СМ первый зрелый цитокиновый белок CP1 **300**, первый необязательный линкер **310**, первый расщепляемый фрагмент CM1 **320**, второй необязательный линкер **330** и первый домен димеризации DD1 **340**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу второй зрелый цитокиновый белок CP2 **350**, третий необязательный линкер **360**, второй расщепляемый фрагмент CM2 **370**, четвертый необязательный линкер **380** и второй домен димеризации DD2 **390**.

На фигуре 2В представлена схема иллюстративной активируемой цитокиновой конструкции, содержащей первую и вторую мономерные конструкции, которые связываются друг с другом ковалентно посредством первого и второго доменов димеризации DD1 **400** и DD2 **450** соответственно. Первая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу компонентов СР и СМ первый домен димеризации DD1 **400**, второй необязательный линкер **410**, первый расщепляемый фрагмент CM1 **420**, первый необязательный линкер **430** и первый зрелый цитокиновый белок CP1 **440**. Вторая мономерная конструкция содержит от N-конца к С-концу компонентов СР и СМ второй домен димеризации DD2 **450**, четвертый необязательный линкер **460**,

второй расщепляемый фрагмент СМ2 **470**, третий необязательный линкер **480** и второй зрелый цитокиновый белок СР2 **490**. В альтернативных аспектах один из двух фрагментов, обозначенных как СР1 440 и СР2 490, представляет собой усеченный цитокиновый белок, который не обладает цитокиновой активностью. Например, либо СР1, либо СР2 может представлять собой усеченный интерферон альфа-2b, имеющий первую 151 аминокислоту интерферона альфа-2b дикого типа. В альтернативных аспектах один из двух фрагментов, обозначенных как СР1 440 и СР2 490, представляет собой мутированный цитокиновый белок, который не обладает цитокиновой активностью. Например, либо СР1, либо СР2 могут представлять собой усеченный интерферон альфа 2b, имеющий мутацию L130P. В альтернативных аспектах один из двух фрагментов, обозначенных как СР1 440 и СР2 490, представляет собой полипептидную последовательность, которая не обладает цитокиновой активностью, например, сигнальный фрагмент и/или последовательность отрезка. В альтернативных аспектах первый из двух фрагментов, обозначенных как СР1 440 и СР2 490, представляет собой полипептидную последовательность, которая с высокой аффинностью связывается со вторым из двух фрагментов, обозначенных как СР1 440 и СР2 490, и снижает цитокиновую активность второго фрагмента по сравнению с контрольным уровнем второго фрагмента.

Было обнаружено, что структура АСС является высокоэффективной для снижения активности компонентов зрелых цитокиновых белков таким образом, что это не приводит к существенному нарушению цитокиновой активности после активации. Условием активации для АСС, описанных в данном документе, является воздействие протеазы, которая может расщеплять по меньшей мере один из расщепляемых фрагментов (СМ) в АСС. Как показано в примерах, активация АСС приводила к существенному восстановлению цитокиновой активности. Результаты предполагают, что конформация компонентов цитокинов не была необратимо изменена в контексте АСС. Примечательно, что АСС не зависит от необходимости идентифицировать и использовать пептидную маску, которая обладает аффинностью связывания с цитокиновым белковым компонентом для достижения маскирующего эффекта. Таким образом, АСС не содержит пептидной маски, обладающей аффинностью связывания с цитокиновым белковым компонентом. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что структуры АСС достаточно, чтобы избежать нецелевой и нежелательной активности и/или токсических побочных эффектов цитокинов без использования каких-либо маскирующих фрагментов, обладающих аффинностью

связывания с цитокиновым белковым компонентом. Таким образом, АСС, описанные в данном документе, характеризуются тем, что в них отсутствуют маскирующие аффинность фрагменты или пептидные маскирующие фрагменты.

АСС может использовать любой из множества зрелых цитокиновых белков, расщепляемых фрагментов и DD в качестве CP1, CP2, CM1, CM2, DD1 и DD2 соответственно. Например, любой из множества зрелых цитокиновых белков, известных в данной области техники, или их последовательности и/или усеченных вариантов могут быть подходящими для применения в качестве одного или обоих компонентов CP1 и CP2 АСС. Зрелые цитокиновые белки, CP1 и CP2, могут быть одинаковыми или разными. В некоторых конкретных вариантах осуществления CP1 и CP2 являются одинаковыми. В других вариантах осуществления CP1 и CP2 являются разными. АСС может содержать дополнительные аминокислотные остатки в одном или обоих N- и/или C-терминальных концах CP1 и/или CP2.

В некоторых вариантах осуществления каждый из CP1 и/или CP2 может независимо содержать зрелый цитокиновый белок, выбранный из группы: интерферона (такого как, например, интерферон альфа, интерферон бета, интерферон гамма, интерферон тау и интерферон омега), интерлейкина (такого как, например, IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-18, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-3, IL-5, GM-CSF, IL-6, IL-11, IL-21), G-CSF, IL-12, LIF, OSM, IL-10, IL-20, IL-14, IL-16, IL-17, CD154, LT- β , TNF- α , TNF- β , 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, EPO α , TPO, Flt-3L, SCF, M-CSF и MSP и т.п., а также их последовательностей и усеченных вариантов. Например, последовательности таких белков включают приведенные в данном документе примеры, и дополнительные последовательности могут быть получены из ncbi.nlm.nih.gov/protein. Усеченные варианты, которые являются подходящими для применения в АСС по настоящему изобретению, включают любой усеченный на N- или C-конце цитокин, который сохраняет цитокиновую активность. Иллюстративные усеченные варианты, используемые в настоящем изобретении, включают любые усеченные цитокиновые полипептиды, известные в данной области техники (см., например, Slutzki et al., *J. Mol. Biol.* 360:1019-1030, 2006, и US 2009/0025106), а также цитокиновые полипептиды, которые усечены на N- и/или C-конце на от 1 до приблизительно 40 аминокислот, от 1 до приблизительно 35 аминокислот, от 1 до приблизительно 30 аминокислот, от 1 до приблизительно 25 аминокислот, от 1 до приблизительно 20 аминокислот, от 1 до приблизительно 15 аминокислот, от 1 до приблизительно 10 аминокислот, от 1 до

приблизительно 8 аминокислот, от 1 до приблизительно 6 аминокислот, от 1 до приблизительно 4 аминокислот, которые сохраняют цитокиновую активность. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления усеченный СР представляет собой усеченный на N-конце СР. В других вариантах осуществления усеченный СР представляет собой усеченный на С-конце СР. В некоторых вариантах осуществления усеченный СР представляет собой усеченный на С- и N-конце СР.

В некоторых вариантах осуществления каждый из CP1 и/или CP2 независимо содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична (например, на по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или на 100% идентична) эталонной последовательности цитокина, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206,

SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 209. Процент идентичности последовательности относится к уровню идентичности аминокислотной последовательности между двумя или более пептидными последовательностями при выравнивании с использованием программы выравнивания последовательностей, например, набора программ BLAST, общедоступных в интернете на веб-сайте NCBI. См. также Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. В некоторых аспектах АСС содержит мутант интерферона-альфа 2b, например, молекулу интерферона альфа-2b, имеющую мутацию в положении L130, например, мутацию L130P, как либо в CP1, либо в CP2. В некоторых аспектах АСС содержит мутант интерферона-альфа 2b, имеющий мутацию в положениях I24, F64, I60, I63, F64, W76, I116, L117, F123 или L128, или их комбинации. Например, мутант интерферона-альфа 2b может содержать мутации I116 в T, N или R; L128 в N, H или R; I24 в P или Q; L117H; или L128T, или их комбинацию. В некоторых аспектах мутант интерферона-альфа 2b может содержать мутации I24Q, I60T, F64A, W76H, I116R и L128N или их подмножество. В некоторых аспектах АСС содержит в качестве одного из CP1 и CP2 усеченную молекулу интерферона-альфа 2b, которая не обладает цитокиновой активностью. Например, усеченный интерферон-альфа-2b может состоять из 151 или менее аминокислот интерферона-альфа-2b, например, любой из аминокислот в последовательности интерферона-альфа-2b дикого типа от N- до C-конца: от 1 до 151, от 1 до 150, от 1 до 149, от 1 до 148, . . . от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6 или от 2 до 151, от 3 до 151, от 4 до 151, от 5 до 150, от 6 до 149, от 7 до 148, от 8 до 147 или любой промежуточной последовательности аминокислот или их мутантов.

В некоторых конкретных вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) интерферон. Интерфероны, которые являются подходящими для применения в конструкциях по настоящему изобретению в качестве CP1 и/или CP2 включают, например, интерферон-альфа, интерферон-бета, интерферон-омега и интерферон-тау. В некоторых вариантах осуществления, когда интерферон представляет собой интерферон альфа, он может представлять собой интерферон-альфа-2a, интерферон-альфа-2b или интерферон-альфа-n3. Дополнительные примеры интерферона-альфа включают интерферон-альфа-1, интерферон-альфа-4, интерферон-альфа-5, интерферон-альфа-6, интерферон-альфа-7, интерферон-альфа-8, интерферон-альфа-10, интерферон-альфа-13, интерферон-альфа-14, интерферон альфа-16, интерферон альфа-17 и интерферон альфа-21. В некоторых вариантах осуществления интерферон представляет собой рекомбинантный или очищенный интерферон-альфа. В определенных вариантах

осуществления, когда интерферон представляет собой интерферон-бета, он выбран из группы, состоящей из интерферона-бета-1a и интерферона-бета-1b. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) домен IFab интерферона-альфа или интерферона-бета. Домен IFab отвечает за высвобождение цитокинов и противовирусные функции интерферонов. Иллюстративные последовательности IFab представлены в SEQ ID No: 325-334.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 проявляет(ют) интерфероновую активность и содержит(ат) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, на по меньшей мере 82% идентична, на по меньшей мере 84% идентична, на по меньшей мере 86% идентична, на по меньшей мере 88% идентична, на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 92% идентична, на по меньшей мере 94% идентична, на по меньшей мере 96% идентична, на по меньшей мере 98% идентична или на по меньшей мере 99% идентична или 100% идентична эталонной последовательности интерферона-альфа, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 и SEQ ID NO: 105. В определенных конкретных вариантах осуществления эталонной последовательностью интерферона-альфа является SEQ ID NO: 1 (интерферон альфа-2b человека). В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) зрелый альфа-интерферон, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 и SEQ ID NO: 105. В определенных вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит зрелый альфа-интерферон человека, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых из описанных выше вариантов осуществления CP1 и CP2 содержат одинаковую аминокислотную последовательность.

В других вариантах осуществления CP1 и/или CP2 проявляет(ют) интерфероновую активность и содержит(ат) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, на по меньшей мере 82% идентична, на по меньшей мере 84% идентична, на по меньшей мере 86% идентична, на по меньшей мере 88% идентична, на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 92% идентична, на по меньшей мере 94% идентична, на по меньшей мере 96% идентична, на по меньшей мере 98% идентична или на по меньшей мере 99% идентична или 100% идентична эталонной последовательности интерферона-бета, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109. В

некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность интерферона-бета представляет собой эталонную последовательность интерферона-бета человека, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 106 и SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) зрелый интерферон-бета, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109. В некоторых из описанных выше вариантов осуществления CP1 и CP2 содержат одинаковую аминокислотную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 проявляет(ют) интерфероновую активность и содержит(ат) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, на по меньшей мере 82% идентична, на по меньшей мере 84% идентична, на по меньшей мере 86% идентична, на по меньшей мере 88% идентична, на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 92% идентична, на по меньшей мере 94% идентична, на по меньшей мере 96% идентична, на по меньшей мере 98% идентична или на по меньшей мере 99% идентична или 100% идентична эталонной последовательности интерферона-омега, соответствующей SEQ ID NO: 110 (интерферон-омега человека). В определенных конкретных вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) зрелый интерферон-омега человека, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110. В некоторых из описанных выше вариантов осуществления CP1 и CP2 содержат одинаковую аминокислотную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 проявляет(ют) интерлейкиновую активность и содержит(ат) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична эталонной последовательности интерлейкина, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140,

SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159 и SEQ ID NO: 160. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) зрелый интерлейкин, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159 и SEQ ID NO: 160. В некоторых из описанных выше вариантов осуществления CP1 и CP2 содержат одинаковую аминокислотную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 проявляет(ют) интерлейкиновую активность и содержит(ат) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична эталонной последовательности интерлейкина, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 111 (IL-1-альфа человека), SEQ ID NO: 113 (IL-1-бета человека), SEQ ID NO: 115 (IL-1RA человека), SEQ ID NO: 117 (IL-18 человека), SEQ ID NO: 119 (IL-2 человека), SEQ ID NO: 121 (IL-4 человека), SEQ ID NO: 123 (IL-7 человека), SEQ ID NO: 125 (IL-9 человека), SEQ ID NO: 127 (IL-13 человека), SEQ ID NO: 129 (IL-15 человека), SEQ ID NO: 131 (IL-3 человека), SEQ ID NO: 133 (IL-5 человека), SEQ ID NO: 137 (IL-6 человека), SEQ ID NO: 139 (IL-11 человека), SEQ ID NO: 143 (IL-12-альфа человека), SEQ ID NO: 144 (IL-12-бета человека), SEQ ID NO: 151 (IL-10 человека), SEQ ID NO: 153 (IL-20 человека), SEQ ID NO: 155 (IL-14 человека), SEQ ID NO: 157 (IL-16 человека) и SEQ ID NO: 159 (IL-17 человека). В определенных из этих вариантов осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) аминокислотную последовательность из группы, состоящей из SEQ ID NO: 111 (IL-1-альфа человека), SEQ ID NO: 113 (IL-1-

бета человека), SEQ ID NO: 115 (IL-1RA человека), SEQ ID NO: 117 (IL-18 человека), SEQ ID NO: 119 (IL-2 человека), SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123 (IL-7 человека), SEQ ID NO: 125 (IL-9 человека), SEQ ID NO: 127 (IL-13 человека), SEQ ID NO: 129 (IL-15 человека), SEQ ID NO: 131 (IL-3 человека), SEQ ID NO: 133 (IL-5 человека), SEQ ID NO: 137 (IL-6 человека), SEQ ID NO: 139 (IL-11 человека), SEQ ID NO: 143 (IL-12-альфа человека), SEQ ID NO: 144 (IL-12-бета человека), SEQ ID NO: 151 (IL-10 человека), SEQ ID NO: 153 (IL-20 человека); SEQ ID NO: 155 (IL-14 человека), SEQ ID NO: 157 (IL-16 человека) и SEQ ID NO: 159 (IL-17 человека). В некоторых из описанных выше вариантов осуществления CP1 и CP2 содержат одинаковую аминокислотную последовательность.

Количество аминокислот в последовательности используемых цитокиновых белков может варьироваться в зависимости от конкретного применяемого цитокинового белка. В некоторых вариантах осуществления CP1 и/или CP2 содержит(ат) в целом от приблизительно 10 до приблизительно 700 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 650 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 600 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 550 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 500 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 450 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 400 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 350 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 300 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 250 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 200 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 150 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 100 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 80 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 60 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот, от приблизительно 20 аминокислот до приблизительно 20 аминокислот, от приблизительно 20 аминокислот до приблизительно 700 аминокислот, от приблизительно 20 аминокислот до приблизительно 650 аминокислот, от приблизительно 20 аминокислот до приблизительно 600 аминокислот, от приблизительно 20 аминокислот до приблизительно 550 аминокислот, от приблизительно 20 аминокислот до

[illegible]

[illegible]

приблизительно 400 аминокислот, от приблизительно 300 аминокислот до
 приблизительно 350 аминокислот, от приблизительно 350 аминокислот до
 приблизительно 700 аминокислот, от приблизительно 350 аминокислот до
 приблизительно 650 аминокислот, от приблизительно 350 аминокислот до
 приблизительно 600 аминокислот, от приблизительно 350 аминокислот до
 приблизительно 550 аминокислот, от приблизительно 350 аминокислот до
 приблизительно 500 аминокислот, от приблизительно 350 аминокислот до
 приблизительно 450 аминокислот, от приблизительно 350 аминокислот до
 приблизительно 400 аминокислот, от приблизительно 400 аминокислот до
 приблизительно 700 аминокислот, от приблизительно 400 аминокислот до
 приблизительно 650 аминокислот, от приблизительно 400 аминокислот до
 приблизительно 600 аминокислот, от приблизительно 400 аминокислот до
 приблизительно 550 аминокислот, от приблизительно 400 аминокислот до
 приблизительно 500 аминокислот, от приблизительно 400 аминокислот до
 приблизительно 450 аминокислот, от приблизительно 450 аминокислот до
 приблизительно 700 аминокислот, от приблизительно 450 аминокислот до
 приблизительно 650 аминокислот, от приблизительно 450 аминокислот до
 приблизительно 600 аминокислот, от приблизительно 450 аминокислот до
 приблизительно 550 аминокислот, от приблизительно 450 аминокислот до
 приблизительно 500 аминокислот, от приблизительно 500 аминокислот до
 приблизительно 700 аминокислот, от приблизительно 500 аминокислот до
 приблизительно 650 аминокислот, от приблизительно 500 аминокислот до
 приблизительно 600 аминокислот, от приблизительно 500 аминокислот до
 приблизительно 550 аминокислот, от приблизительно 550 аминокислот до
 приблизительно 700 аминокислот, от приблизительно 550 аминокислот до
 приблизительно 650 аминокислот, от приблизительно 550 аминокислот до
 приблизительно 600 аминокислот, от приблизительно 600 аминокислот до
 приблизительно 700 аминокислот, от приблизительно 600 аминокислот до
 приблизительно 650 аминокислот или от приблизительно 650 аминокислот до
 приблизительно 700 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления СР1 и/или
 СР2 представляет(ют) собой зрелый цитокиновый белок человека дикого типа.

Каждая мономерная конструкция АСС может использовать любой из множества доменов димеризации. Подходящие DD включают как полимерные (например, синтетический полимер, полипептид, полинуклеотид и т.п.), так и низкомолекулярные

(неполимерные фрагменты с молекулярной массой менее приблизительно 1 килодальтон, а иногда и менее приблизительно 800 дальтон) типы фрагментов. Пара DD может представлять собой любую пару фрагментов, которые, как известно в данной области техники, связываются друг с другом.

Например, в некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 являются членами пары, выбранной из группы: домена sushi из альфа-цепи рецептора IL-15 человека (IL15R α) и растворимого IL-15; барназы и барнстара; PKA и AKAP; молекул тегов адаптер/докинг на основе мутированных фрагментов РНКазы I; пары антигенсвязывающих доменов (например, пары однодоменных антител); модулей растворимых N-этилмалеимид-чувствительных белковых рецепторов прикрепления (SNARE), основанных на взаимодействиях белков синтаксина, синаптотегмина, синаптобrevина и SNAP25; однодоменного антитела (sdAb) и соответствующего эпитопа; антигенсвязывающего домена (например, одноцепочечного антитела, такого как одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), однодоменного антитела и т.п.) и соответствующего эпитопа; спиральных полипептидных структур спирального типа (например, спиральных структур спирального типа Fos-Jun, спиральных структур кислота/основание спирального типа, спиральных структур Glu-Lys спирального типа, структур типа лейциновой молнии), связывающих пар малых молекул, таких как биотин и авидин или стрептавидин, амин/альдегид, лектин/углевод; пары полимеров, которые могут связываться друг с другом, такой как, например, пара серо- или тиолсодержащих полимеров (например, пара Fc-доменов, пара тиолизированных полипептидов сывороточного альбумина человека и т.п.); и т.п.

В некоторых вариантах осуществления DD1 и DD2 не являются полипептидными полимерами. Неполипептидные полимеры могут ковалентно связываться друг с другом. В некоторых примерах неполипептидные полимеры могут представлять собой серосодержащий полимер, например, серосодержащий полиэтиленгликоль. В таких случаях DD1 и DD2 могут быть ковалентно связаны друг с другом посредством одной или нескольких дисульфидных связей.

Когда пара DD1 и DD2 является членами пары эпитопа и антигенсвязывающего домена, эпитоп может представлять собой встречающийся в природе или не встречающийся в природе эпитоп. Примеры не встречающихся в природе эпитопов включают, например, не встречающийся в природе пептид, такой как, например, поли-His-пептид (например, His-тег и т.п.).

В определенных конкретных вариантах осуществления DD1 и DD2

представляют собой пару Fc-доменов. Используемый в данном документе термин «Fc-домен» относится к непрерывной аминокислотной последовательности одной тяжелой цепи иммуноглобулина. Пара Fc-доменов связывается вместе, образуя Fc-область иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления пара Fc-доменов представляет собой пару Fc-доменов человека (например, пару Fc-доменов человека дикого типа). В некоторых вариантах осуществления Fc-домены человека представляют собой Fc-домены IgG1 человека (например, Fc-домены IgG1 человека дикого типа), Fc-домены IgG2 человека (например, Fc-домены IgG2 человека дикого типа), Fc-домены IgG3 человека (например, Fc-домены IgG3 человека дикого типа) или Fc-домены IgG4 человека (например, Fc-домены IgG4 человека дикого типа). В некоторых вариантах осуществления Fc-домены человека содержат последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична (например, на по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична) SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления пара Fc-доменов содержит мутант типа выступ и мутант типа впадина Fc-домена. Мутанты типа выступ и впадин могут взаимодействовать друг с другом, облегчая димеризацию. В некоторых вариантах осуществления мутанты типа выступ и впадина могут содержать одну или несколько аминокислотных модификаций на поверхности раздела между двумя Fc-доменами (например, в домене CH3). В одном примере модификации включают аминокислотную замену T366W и необязательно аминокислотную замену S354C в одной из тяжелых цепей антитела и аминокислотные замены T366S, L368A, Y407V и необязательно Y349C в другой тяжелой цепи антитела (нумерация в соответствии с EU-индексом системы нумерации Kabat). Примеры мутантов типа выступ и впадина включают мутанты Fc SEQ ID NO: 315 и 316, а также мутанты, описанные в патентах США №№ 5731168; 7695936; и 10683368, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления домены димеризации содержат последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична (например, на по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере

96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична) SEQ ID NO: 315 и 316 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления DD1 и/или DD2 может(гут) дополнительно включать фрагмент, удлиняющий период полужизни в сыворотке крови (например, полипептиды, которые связывают сывороточные белки, такие как иммуноглобулин (например, IgG) или сывороточный альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин (HSA))). Примеры фрагментов, удлиняющих период полужизни, включают фрагмент аффинности к глутатиону hexa-hat GST (глутатион-S-трансфераза), кальмодулин-связывающий пептид (CBP), Strep-тег, домен связывания целлюлозы, белок, связывающий мальтозу, тег S-пептида, тег связывания хитина, иммунореактивные эпитопы, теги эпитопов, E2-тег, тег эпитопа HA, эпитоп Мус, эпитоп FLAG, эпитопы AU1 и AU5, эпитоп Glu-Glu, эпитоп KT3, эпитоп IRS, эпитоп Btag, эпитоп протеинкиназы-С и эпитоп VSV.

В некоторых вариантах осуществления каждый из DD1 и/или DD2 содержит в целом от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 250 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 200 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 180 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 160 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 140 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 120 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 100 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 80 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 60 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 20 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 10 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 250 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 200 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 180 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 160 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 140 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 120 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 100 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 80 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 60 аминокислот, от

[illegible]

приблизительно 80 аминокислот до приблизительно 120 аминокислот, от
 приблизительно 80 аминокислот до приблизительно 100 аминокислот, от
 приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 250 аминокислот, от
 приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 200 аминокислот, от
 приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 180 аминокислот, от
 приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 160 аминокислот, от
 приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 140 аминокислот, от
 приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 120 аминокислот, от
 приблизительно 120 аминокислот до приблизительно 250 аминокислот, от
 приблизительно 120 аминокислот до приблизительно 200 аминокислот, от
 приблизительно 120 аминокислот до приблизительно 180 аминокислот, от
 приблизительно 120 аминокислот до приблизительно 160 аминокислот, от
 приблизительно 120 аминокислот до приблизительно 140 аминокислот, от
 приблизительно 140 аминокислот до приблизительно 250 аминокислот, от
 приблизительно 140 аминокислот до приблизительно 200 аминокислот, от
 приблизительно 140 аминокислот до приблизительно 180 аминокислот, от
 приблизительно 140 аминокислот до приблизительно 160 аминокислот, от
 приблизительно 160 аминокислот до приблизительно 250 аминокислот, от
 приблизительно 160 аминокислот до приблизительно 200 аминокислот, от
 приблизительно 160 аминокислот до приблизительно 180 аминокислот, от
 приблизительно 180 аминокислот до приблизительно 250 аминокислот, от
 приблизительно 180 аминокислот до приблизительно 200 аминокислот или от
 приблизительно 200 аминокислот до приблизительно 250 аминокислот. В некоторых
 вариантах осуществления каждый из DD1 и DD2 представляет собой Fc-домен,
 который содержит часть шарнирной области, которая содержит два остатка цистеина,
 домен CH2 и домен CH3. В некоторых вариантах осуществления каждый из DD1 и DD2
 представляет собой Fc-домен, N-конец которого представляет собой первый остаток
 цистеина в шарнирной области, прочитанный в направлении от N к C (например,
 цистеин 226 IgG1 или IgG4 человека, с использованием EU-нумерации).

В некоторых аспектах между компонентами CP и DD непосредственно или
 опосредованно (например, посредством линкера) расположен расщепляемый фрагмент,
 который содержит субстрат для протеазы. В некоторых вариантах осуществления
 каждый из CM1 и CM2 может независимо содержать субстрат для протеазы, выбранной
 из группы, состоящей из ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15,

ADAM17/TACE, ADEMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, BACE, ренина, катепсина D, катепсина E, каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 14, катепсина A, катепсина B, катепсина C, катепсина G, катепсина K, катепсина L, катепсина S, катепсина V/L2, катепсина X/Z/P, химазы, крузипаина, DESC1, DPP-4, FAP, легумаина, отубаина-2, эластазы, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, гранзима B, гуанидинобензоатазы, гепсина, HtrA1, нейтрофильной эластазы человека, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, KLK14, лактоферрина, марапсина, матриптазы-2, меприна, MT-SP1/матриптазы, неприлизина, NS3/4A, PACE4, плазмина, PSMA, PSA, BMP-1, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP19, MMP20, MMP23, MMP24, MMP26, MMP27, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4, tPA, тромбина, триптазы и uPA.

В некоторых вариантах осуществления ACC, описанных в данном документе, протеаза, которая расщепляет любой из CM, описанных в данном документе, может представлять собой ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADEMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, BACE, ренин, катепсин D, катепсин E, каспазу 1, каспазу 2, каспазу 3, каспазу 4, каспазу 5, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 8, каспазу 9, каспазу 10, каспазу 14, катепсин B, катепсин C, катепсин K, катепсин L, катепсин S, катепсин V/L2, катепсин X/Z/P, крузипаин, легумаин, отубаин-2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, KLK14, меприн, неприлизин, PSMA, BMP-1, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-24, MMP-26, MMP-27, активированный белок C, катепсин A, катепсин G, химазу, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, эластазу, гранзим B, гуанидинобензоатазу, HtrA1, нейтрофилиязу человека, лактоферрин, марапсин, NS3/4A, PACE4, плазмин, PSA, tPA, тромбин, триптазу, uPA, DESC1, DPP-4, FAP, гепсин, матриптазу-2, MT-SP1/матриптазу, TMPRSS2, TMPRSS3 и TMPRSS4.

В некоторых вариантах осуществления любого из ACC, описанных в данном документе, протеаза выбрана из группы: uPA, legumain, MT-SP1, ADAM17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13 и MMP-14.

Сообщалось о повышенных уровнях протеаз, имеющих известные субстраты, при ряде различных видов рака. См., например, La Roca et al., *British J. Cancer*. 90(7):1414-1421, 2004. Субстраты, подходящие для применения в компонентах CM1 и/или CM2, используемые в данном документе, включают те, которые чаще

обнаруживаются в раковых клетках и ткани. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления каждый из CM1 и/или CM2 независимо содержит субстрат для протеазы, которая чаще обнаруживается в пораженной ткани, ассоциированной с раком. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы: рака желудка, рака молочной железы, остеосаркомы и рака пищевода. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой HER2-положительный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой саркому Капоши, волосатоклеточный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз (CML), фолликулярную лимфому, почечно-клеточный рак (RCC), меланому, нейробластому, базально-клеточную карциному, кожную Т-клеточную лимфому, носоглоточную аденокарциому, рак молочной железы, рак яичников, рак мочевого пузыря, BCG-резистентный немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (NMIBC), рак эндометрия, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), колоректальный рак, рак пищевода, рак желчного пузыря, глиому, карциному головы и шеи, рак матки, рак шейки матки или рак яичек и т.п. В некоторых из вышеописанных вариантов осуществления компоненты CM содержат субстраты для протеаз(ы), которая(ые) чаще встречается в опухолевой ткани.

В некоторых вариантах осуществления каждый из CM1 и/или CM2 независимо содержит(ат) последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 – SEQ ID NO: 100, а также их С-концевые и N-концевые усеченные варианты.

В некоторых вариантах осуществления CM содержит последовательность, выбранную из группы: ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), и ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68).

В некоторых вариантах осуществления CM1 и/или CM2 содержит(ат) последовательность, выбранную из группы: APRSALAHGLF (SEQ ID NO: 263), AQNLLGMY (SEQ ID NO: 264), LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 265), VHMP LGFLGP GGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 266), LSGRSDNHGGVHMP LGFLGP (SEQ ID NO: 267), LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 268), ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 269), LSGRSDNHGGSGGSGNQALRMA (SEQ ID NO: 270), QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 271), LSGRSGNHGGSGGSGNQALRMA (SEQ ID NO: 272), QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 273), ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 274), а также их С-концевые и N-концевые усеченные варианты. Примеры CM также

включают описанные в публикациях патентных заявок США №№ 2016/0289324, 2019/0284283, и в публикаций под номерами WO 2010/081173, WO 2015/048329, WO 2015/116933, WO 2016/118629 и WO 2020/118109, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Усеченные варианты вышеупомянутых аминокислотных последовательностей, которые являются подходящими для применения в CM1 и/или CM2, представляют собой любые, которые сохраняют сайт узнавания для соответствующей протеазы. К ним относятся С-концевые и/или N-концевые усеченные варианты, содержащие по меньшей мере 3 смежные аминокислоты вышеописанных аминокислотных последовательностей, или по меньшей мере 4, или по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7 аминокислот вышеуказанных аминокислотных последовательностей, которые сохраняют сайт узнавания протеазы. В некоторых вариантах осуществления усеченный вариант вышеописанных аминокислотных последовательностей представляет собой аминокислотную последовательность, соответствующую любой из вышеперечисленных, но являющуюся усеченной на С- и/или N-конце на от 1 до приблизительно 10 аминокислот, от 1 до приблизительно 9 аминокислот, от 1 до приблизительно 8 аминокислот, от 1 до приблизительно 7 аминокислот, от 1 до приблизительно 6 аминокислот, от 1 до приблизительно 5 аминокислот, от 1 до приблизительно 4 аминокислот или от 1 до приблизительно 3 аминокислот, и который: (1) содержит по меньшей мере три аминокислотных остатка; и (2) сохраняет сайт распознавания для протеазы. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления усеченный CM представляет собой усеченный на N-конце CM. В некоторых вариантах осуществления усеченный CM представляет собой усеченный на С-конце CM. В некоторых вариантах осуществления усеченный С представляет собой усеченный на С- и N-конце CM.

В некоторых вариантах осуществления любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, CM1 и/или CM2 содержит(ат) в целом от приблизительно 3 аминокислот до приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CM1 и/или CM2 содержит(ат) в целом от приблизительно 3 аминокислот до приблизительно 25 аминокислот, от приблизительно 3 аминокислот до приблизительно 20 аминокислот, от приблизительно 3 аминокислот до приблизительно 15 аминокислот, от приблизительно 3 аминокислот до приблизительно 10 аминокислот, от приблизительно 3 аминокислот до приблизительно 5 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 25 аминокислот, от приблизительно

5 аминокислот до приблизительно 20 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 15 аминокислот, от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 10 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 25 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 20 аминокислот, от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 15 аминокислот, от приблизительно 15 аминокислот до приблизительно 25 аминокислот, от приблизительно 15 аминокислот до приблизительно 20 аминокислот или от приблизительно 20 аминокислот до приблизительно 25 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления АСС может содержать несколько СМ, которые содержат субстраты для разных протеаз. В некоторых вариантах осуществления СМ1 и СМ2 содержат субстраты для разных протеаз. В некоторых вариантах осуществления СМ1 и СМ2 содержат два или более субстратов для одной и той же протеазы.

Первая и вторая мономерные конструкции могут содержать один или несколько дополнительных компонентов, включая один или несколько линкеров и т.п. В некоторых вариантах осуществления первый мономер может содержать линкер, расположенный между СР1 и СМ1. В некоторых вариантах осуществления СР1 и СМ1 непосредственно примыкают друг к другу в первом мономере. В некоторых вариантах осуществления первый мономер содержит линкер, расположенный между СМ1 и DD1. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет общую длину от 1 аминокислоты до приблизительно 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления СМ1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу в первом мономере. В некоторых вариантах осуществления СМ и линкеры, расположенные между СР1 и DD1, имеют общую длину от 3 до 15 аминокислот, или от 3 до 10 аминокислот, или от 3 до 7 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления второй мономер содержит линкер, расположенный между СР2 и СМ2. В некоторых вариантах осуществления СР2 и СМ2 непосредственно примыкают друг к другу во втором мономере. В некоторых вариантах осуществления второй мономер содержит линкер, расположенный между СМ2 и DD2. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет общую длину от 1 аминокислоты до приблизительно 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность GGGS (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления СМ2 (например, любой из расщепляемых фрагментов, описанных в данном документе) и DD2 (например, любой из DD, описанных в данном

документе) непосредственно примыкают друг к другу во втором мономере. В некоторых вариантах осуществления СМ и линкеры, расположенные между СР2 и DD2, имеют общую длину от 3 до 15 аминокислот, или от 3 до 10 аминокислот, или от 3 до 7 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления первый мономер и/или второй мономер могут содержать в целом от приблизительно 50 до приблизительно 800 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 750 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 700 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 650 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 600 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 550 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 500 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 450 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 400 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 350 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 300 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 250 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 200 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 150 аминокислот, от приблизительно 50 аминокислот до приблизительно 100 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 800 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 750 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 700 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 650 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 600 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 550 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 500 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 450 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 400 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 350 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 300 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 250 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 200 аминокислот, от приблизительно 100 аминокислот до приблизительно 150 аминокислот, от

[illegible]

[illegible]

приблизительно 450 аминокислот до приблизительно 550 аминокислот, от
 приблизительно 450 аминокислот до приблизительно 500 аминокислот, от
 приблизительно 500 аминокислот до приблизительно 800 аминокислот, от
 приблизительно 500 аминокислот до приблизительно 750 аминокислот, от
 приблизительно 500 аминокислот до приблизительно 700 аминокислот, от
 приблизительно 500 аминокислот до приблизительно 650 аминокислот, от
 приблизительно 500 аминокислот до приблизительно 600 аминокислот, от
 приблизительно 500 аминокислот до приблизительно 550 аминокислот, от
 приблизительно 550 аминокислот до приблизительно 800 аминокислот, от
 приблизительно 550 аминокислот до приблизительно 750 аминокислот, от
 приблизительно 550 аминокислот до приблизительно 700 аминокислот, от
 приблизительно 550 аминокислот до приблизительно 650 аминокислот, от
 приблизительно 550 аминокислот до приблизительно 600 аминокислот, от
 приблизительно 600 аминокислот до приблизительно 800 аминокислот, от
 приблизительно 600 аминокислот до приблизительно 750 аминокислот, от
 приблизительно 600 аминокислот до приблизительно 700 аминокислот, от
 приблизительно 600 аминокислот до приблизительно 650 аминокислот, от
 приблизительно 650 аминокислот до приблизительно 800 аминокислот, от
 приблизительно 650 аминокислот до приблизительно 750 аминокислот, от
 приблизительно 650 аминокислот до приблизительно 700 аминокислот, от
 приблизительно 700 аминокислот до приблизительно 800 аминокислот, от
 приблизительно 700 аминокислот до приблизительно 750 аминокислот или от
 приблизительно 750 аминокислот до приблизительно 800 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, один или несколько линкеров (например, гибких линкеров) могут быть введены в активируемую цитокиновую конструкцию для обеспечения гибкости в одном или нескольких соединениях между доменами, между фрагментами, между фрагментами и доменами или в любых других соединениях, где линкер был бы полезен. В некоторых вариантах осуществления, где АСС предоставляется в виде конформационно ограниченной конструкции, может быть вставлен гибкий линкер для облегчения образования и поддержания структуры в нерасщепляемой активируемой цитокиновой конструкции. Любой из линкеров, описанных в данном документе, может обеспечить требуемую гибкость для облегчения ингибирования связывания мишени (например, цитокинового рецептора) или для облегчения расщепления СМ протеазой. В

некоторых вариантах осуществления линкеры включены в АСС, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может включать гибкий линкер, а также одну или несколько частей, которые придают менее гибкую структуру для обеспечения требуемой АСС. Некоторые линкеры могут включать остатки цистеина, которые могут образовывать дисульфидные связи и снижать гибкость конструкции. В некоторых вариантах осуществления уменьшение длины линкеров или связывающей области снижает активность зрелого цитокинового белка в АСС (см., например, фигуры 8А-8В и 10А-10В). В большинстве случаев длину линкера определяют путем подсчета в направлении от N к C количества аминокислот от N-конца линкера, примыкающего к C-концевой аминокислоте предыдущего компонента, до C-конца линкера, примыкающего к N-концевой аминокислоте следующего компонента (т.е. когда длина линкера не включает ни C-концевую аминокислоту предыдущего компонента, ни N-концевую аминокислоту следующего компонента). В вариантах осуществления, в которых линкер используется на N-конце DD, который содержит Fc-домен, длину линкера определяют путем подсчета количества аминокислот от N-конца линкера, примыкающего к C-концевой аминокислоте предшествующего компонента до C-конца линкера, примыкающего к первому цистеину шарнирной области Fc (т.е., где длина линкера не включает C-концевую аминокислоту предшествующего компонента или первый цистеин шарнирной области Fc).

Как видно из настоящего описания и фигуры 25, АСС по настоящему изобретению содержат участок аминокислот между CP и проксимальной точкой взаимодействия между доменами димеризации. Этот участок аминокислот можно назвать связывающей областью (LR). Используемый в данном документе термин «связывающая область» или «LR» относится к участку аминокислотных остатков между C-концом цитокина и аминокислотным остатком, который находится на N-конце рядом с проксимальной точкой взаимодействия между доменами димеризации (т.е. связывающая область не включает C-концевую аминокислоту цитокина или N-концевую аминокислоту DD, которая образует проксимальную точку взаимодействия с DD соответствующего второго мономера). Например, когда DD представляют собой пару Fc-доменов, связывающая область представляет собой участок аминокислотных остатков между C-концом цитокина и первым N-концевым остатком цистеина, который участвует в образовании дисульфидной связи Fc (например, цистеин 226 Fc-домена IgG1 или IgG4 в соответствии с EU-нумерацией). Когда домен димеризации не является пептидом, тогда связывающая область представляет собой участок аминокислотных

остатков, следующий за С-концом цитокина до последней аминокислоты. Например, когда DD представляют собой пару биотин-стрептавидин, связывающая область биотин-содержащего мономера представляет собой участок аминокислотных остатков между С-концом цитокина и молекулой биотина, а связывающая область стрептавидин-содержащего мономера представляет собой участок аминокислотных остатков между С-концом цитокина и молекулой стрептавидина. В некоторых аспектах связывающая область может содержать не более 24, 18, 14, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 аминокислот, например, от 5 до 14, от 7 до 12 или от 8 до 11 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления дополнительные аминокислотные последовательности могут быть расположены на N-конце или С-конце любого из доменов любой из АСС. Примеры включают без ограничения нацеливающие фрагменты (например, лиганд для рецептора клетки, присутствующей в ткани-мишени) и фрагменты, удлиняющие период полужизни в сыворотке крови (например, полипептиды, которые связывают белки сыворотки крови, такие как иммуноглобулин (например, IgG) или сывороточный альбумин (например, сывороточный альбумин человека (HSA))).

В некоторых вариантах осуществления любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, линкер может содержать в целом от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 25 аминокислот (например, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 24 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 22 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 20 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 18 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 16 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 15 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 14 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 12 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 10 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 8 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 6 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 5 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 4 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 3 аминокислот, от приблизительно 1 аминокислоты до приблизительно 2 аминокислот, от приблизительно 2 аминокислот до приблизительно 25 аминокислот, от

[illegible]

[illegible]

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, линкер содержит в целом приблизительно 1 аминокислоту, приблизительно 2 аминокислоты, приблизительно 3 аминокислоты, приблизительно 4 аминокислоты, приблизительно 5 аминокислот, приблизительно 6 аминокислот, приблизительно 7 аминокислот, приблизительно 8 аминокислот, приблизительно 9 аминокислот, приблизительно 10 аминокислот, приблизительно 11 аминокислот, приблизительно 12

аминокислот, приблизительно 13 аминокислот, приблизительно 14 аминокислот, приблизительно 15 аминокислот, приблизительно 16 аминокислот, приблизительно 17 аминокислот, приблизительно 18 аминокислот, приблизительно 19 аминокислот, приблизительно 20 аминокислот, приблизительно 21 аминокислоту, приблизительно 22 аминокислоты, приблизительно 23 аминокислоты, приблизительно 24 аминокислоты или приблизительно 25 аминокислот.

Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что ACC, которые не содержат каких-либо линкеров между CP и DD, демонстрируют наиболее значимое снижение цитокиновой активности по сравнению со зрелым цитокином дикого типа. См. фиг. 8А и 10А. Кроме того, конфигурация, в которой линкеры между CP и DD отсутствуют, по-прежнему обеспечивает эффективное расщепление CM, расположенного между CP и DD. См. фиг. 12-14. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления ACC не содержит линкеров между CP и DD, а CM между CP и DD содержит не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления общее количество аминокислот в LR составляет не более 25 аминокислот, например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 аминокислот, или от 3 до 10 аминокислот, или от 5 до 15 аминокислот, или от 7 до 12 аминокислот, или любой диапазон или конкретное число аминокислот, выбранных из диапазона, охватываемого от 3 до 25 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления любой из ACC, описанных в данном документе, линкер может быть обогащен остатками глицина (Gly или G). В некоторых вариантах осуществления линкер может быть обогащен остатками серина (Ser или S). В некоторых вариантах осуществления линкер может быть обогащен остатками глицина и серина. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет одну или несколько пар остатков глицин-серин (GS) (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более пар GS). В некоторых вариантах осуществления линкер имеет одну или несколько последовательностей Gly-Gly-Gly-Ser (GGGS) (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более последовательностей GGGS). В некоторых вариантах осуществления линкер имеет одну или несколько последовательностей Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (GGGGS) (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более последовательностей GGGGS). В некоторых вариантах осуществления линкер имеет одну или несколько последовательностей Gly-Gly-Ser-Gly (GGSG) (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более последовательностей GGSG).

В некоторых вариантах осуществления любой из ACC, описанных в данном

документе, линкер содержит любое из или комбинацию одного или нескольких из: GSSGSGGSGG (SEQ ID NO: 210), GGGS (SEQ ID NO: 2), GGGSGGGS (SEQ ID NO: 211), GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 212), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 215), GGGGS (SEQ ID NO: 216), GS, GGGSGS (SEQ ID NO: 217), GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 218), GGS LDPKGGGGS (SEQ ID NO: 219), PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 220), SKYGPPCPPCPAPEFLG (SEQ ID NO: 221), GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 222), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 223), GSTSGSGKSSEGSGSTKG (SEQ ID NO: 224) и GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 225).

Неограничивающие примеры линкеров могут содержать последовательность, которая идентична на по меньшей мере 70% (например, идентична на по меньшей мере 72%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) GGGS (SEQ ID NO: 2), GSSGSGGSGG (SEQ ID NO: 210), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213), GGGSGS (SEQ ID NO: 217), GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 218), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214), GGS LDPKGGGGS (SEQ ID NO: 215) и GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226).

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит последовательность, выбранную из группы: GGS LDPKGGGGS (SEQ ID NO: 219), GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 218), GGGSGS (SEQ ID NO: 217), GS, (GS)_n, (GGG)_n, (GSGG)_n (SEQ ID NO: 227) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 228), GGSG (SEQ ID NO: 229), GGSGG (SEQ ID NO: 230), GSGSG (SEQ ID NO: 231), GSGGG (SEQ ID NO: 232), GGGSG (SEQ ID NO: 233), GSSSG (SEQ ID NO: 234), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214), GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226), (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 216), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере одному. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: GGS LDPKGGGGS (SEQ ID NO: 219), GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 218), GGGSGS (SEQ ID NO: 217) и GS. В некоторых вариантах осуществления любой из ACC, описанных в

данном документе, линкер содержит последовательность, выбранную из группы: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214) и GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226). В некоторых вариантах осуществления любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, линкер содержит последовательность, выбранную из группы: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213) или GGGGS (SEQ ID NO: 216). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления АСС может содержать одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять линкерных последовательностей (например, одинаковые или разные линкерные последовательности любой из иллюстративных линкерных последовательностей, описанных в данном документе или известных в данной области техники). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит сульфо-SIAB, SMPB и сульфо-SMPB, при этом линкеры реагируют с сульфгидрилами первичных аминов.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС характеризуется снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень может представлять собой уровень активности рекомбинантного CP1 и/или CP2 (например, коммерчески доступного рекомбинантного CP1 и/или CP2, рекомбинантного CP1 дикого типа и/или CP2 и т.п.). В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень может представлять собой уровень активности расщепленной (активированной) формы АСС. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень может представлять собой уровень активности пегилированного CP1 и/или CP2.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность представляет собой аффинность связывания (K_D) CP1 и/или CP2 в отношении его когнатного рецептора, как определено с использованием поверхностного плазмонного резонанса (например, выполненного в фосфатно-солевом буфере при 25 °C). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность представляет собой уровень пролиферации клеток лимфомы. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна активность представляет собой уровень активации пути JAK/STAT/ISGF3 в клетке лимфомы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна активность представляет собой уровень продуцирования SEAP в

клетке лимфомы. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна активность CP1 и/или CP2 представляет собой уровень стимулируемой цитокинами индукции генов с использованием, например, методов RNAseq (см., например, Zimmerer et al., *Clin. Cancer Res.* 14(18):5900-5906, 2008; Hilkens et al., *J. Immunol.* 171:5255-5263, 2003).

В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 2-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 5-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 10-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 20-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 30-кратным, 40-кратным, 50-кратным, 60-кратным, 70-кратным, 80-кратным, 90-кратным, 100-кратным, 500-кратным или 1000-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2. В некоторых вариантах осуществления АСС характеризуется по меньшей мере 1-20-кратным снижением, 200-500-кратным снижением, 300-500-кратным снижением, 400-500-кратным снижением, 500-600-кратным снижением, 600-700-кратным снижением, 150-1000-кратным снижением, 100-1500-кратным снижением, 200-1500-кратным снижением, 300-1500-кратным снижением, 400-1500-кратным снижением, 500-1500-кратным снижением, 1000-1500-кратным снижением, 100-1000-кратным снижением, 200-1000-кратным снижением, 300-1000-кратным снижением, 400-1000-кратным снижением, 500-1000-кратным снижением, 100-500-кратным снижением, 20-50-кратным снижением, 30-50-кратным снижением, 40-50-кратным снижением, 100-400-кратным снижением, 200-400-кратным снижением, 300-400-кратным снижением, 100-300-кратным снижением, 200-300-кратным снижением или 100-200-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2.

В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 представляет собой активность CP1 и/или CP2, высвобожденного(ых) из АСС после расщепления CM1 и CM2 протеазой(ами) («продукт расщепления»). В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 представляет собой активность соответствующего зрелого цитокина дикого типа (например, рекомбинантного зрелого цитокина дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления инкубация АСС с протеазой приводит к образованию активированного(ых) цитокинового(ых) продукта(ов), при этом одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 активированного(ых) цитокинового(ых) продукта(ов) является более высокой, чем одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 интактного АСС. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 активированного(ых) цитокинового(ых) продукта(ов) по меньшей мере в 1 раз выше, чем одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 АСС. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 активированного(ых) цитокинового(ых) продукта(ов) по меньшей мере в 2 раза выше, чем одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 АСС. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 активированного(ых) цитокинового(ых) продукта(ов) по меньшей мере в 5 раз выше, чем одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 АСС. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 активированного(ых) цитокинового(ых) продукта(ов) по меньшей мере в 10 раз выше, чем одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 АСС. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 активированного(ых) цитокинового(ых) продукта(ов) по меньшей мере в 20 раз выше, чем одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 АСС. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2 активированного(ых) цитокинового(ых) продукта(ов) по меньшей мере в 1-20 раз выше, в 2-20 раз выше, в 3-20 раз выше, в 4-20 раз выше, в 5-20 раз выше, в 10-20 раз выше, в 15-20 раз выше, в 1-15 раз выше, в 2-15 раз выше, в 3-15 раз выше, в 4-15 раз выше, в 5-15 раз выше, в 10-15 раз выше, в 1-10 раз выше, в 2-10 раз выше, в 3-10 раз выше, в 4-10 раз выше, в 5-10 раз выше, в 1-5 раз выше, в 2-5 раз выше, в 3-5 раз выше, в 4-5 раз выше, в 1-4 раза выше, в 2-4 раза выше, больше, в 3-4 раза выше, в 1-3 раза выше, в 2-3 раза выше или в 1-2 раза выше, чем одна или несколько из активностей CP1 и/или CP2

АСС.

В некоторых вариантах осуществления АСС может содержать последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична) SEQ ID NO: 309 или 311. В некоторых вариантах осуществления АСС может кодироваться нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, которая на по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентична SEQ ID NO: 310 или 312. В некоторых аспектах АСС может содержать такие последовательности, но без каких-либо сигнальных последовательностей этих последовательностей. Сигнальные последовательности конкретно не ограничены. Некоторые неограничивающие примеры сигнальных последовательностей включают, например, остатки 1-20 SEQ ID NO: 309 и соответствующие остатки и нуклеотиды в других последовательностях, или заменены сигнальной последовательностью другого вида или клеточной линии. Другие примеры сигнальных последовательностей включают MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 343) и MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG (SEQ ID NO: 344).

Различные иллюстративные аспекты этих активируемых цитокиновых конструкций описаны ниже и могут быть использованы в любой комбинации в способах, представленных в данном документе, без ограничения. Иллюстративные аспекты активируемых цитокиновых конструкций и способов получения активируемых цитокиновых конструкций описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления СМ выбран для применения с определенной протеазой. Протеаза может быть продуцируемой опухолевой клеткой (например, опухолевая клетка может экспрессировать большее количество протеазы, чем здоровые ткани). Таким образом, в конкретных случаях СМ представляет собой субстрат для по меньшей мере одной протеазы, выбранной из группы ADAM 17, BMP-1, цистеиновой протеазы, такой как катепсин, HtrA1, легумаина, матриптазы (MT-SP1), матриксной металлопротеазы (MMP), нейтрофильной эластазы, TMPRSS, такой как TMPRSS3 или TMPRSS4, тромбина и активатор плазминогена u-типа (uPA, также обозначаемого урокиназой).

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для по меньшей мере одной матриксной металлопротеиназы (ММР). Примеры ММР включают ММР1, ММР2, ММР3, ММР7, ММР8, ММР9, ММР10, ММР11, ММР12, ММР13, ММР14, ММР15, ММР16, ММР17, ММР19, ММР20, ММР23, ММР24, ММР26 и ММР27. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для ММР9, ММР14, ММР1, ММР3, ММР13, ММР17, ММР11 и ММР19. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для ММР7. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для ММР9. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для ММР14. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для двух или более ММР. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для по меньшей мере ММР9 и ММР14. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит два или более субстратов для одной и той же ММР. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит по меньшей мере два или более субстратов для ММР9. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит по меньшей мере два или более субстратов для ММР14.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для ММР и содержит последовательность ISSGLSS (SEQ ID NO: 19); QNQALRMA (SEQ ID NO: 16); AQNLLGMV (SEQ ID NO: 15); STFPFGMF (SEQ ID NO: 18); PVGYTSSL (SEQ ID NO: 74); DWLYWPGI (SEQ ID NO: 75); MIAPVAYR (SEQ ID NO: 42); RPSPMWAY (SEQ ID NO: 43); WATPRPMR (SEQ ID NO: 44); FRLLDWQW (SEQ ID NO: 45); LKAAPRWA (SEQ ID NO: 76); GPSHLVLT (SEQ ID NO: 77); LPGGLSPW (SEQ ID NO: 78); MGLFSEAG (SEQ ID NO: 79); SPLPLRVP (SEQ ID NO: 80); RMHLRSLG (SEQ ID NO: 81); LAAPLGLL (SEQ ID NO: 17); AVGLLAPP (SEQ ID NO: 14); LLAPSHRA (SEQ ID NO: 82); PAGLWLDP (SEQ ID NO: 20); и/или ISSGLSS (SEQ ID NO: 73).

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для тромбина. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для тромбина и содержит последовательность GPRSFGL (SEQ ID NO: 83) или GPRSFG (SEQ ID NO: 84).

В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 9); NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 10); TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 11); TSGRSANP (SEQ ID NO: 12); VAGRSMRP (SEQ ID NO: 21); VVPEGRRS (SEQ ID NO: 22);

ILPRSPAF (SEQ ID NO: 23); MVLGRSLL (SEQ ID NO: 24); QGRAITFI (SEQ ID NO: 25); SPRSIMLA (SEQ ID NO: 26); и SMLRSMPL (SEQ ID NO: 27).

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для нейтрофильной эластазы. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для по меньшей мере одной сериновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для uPA. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для легумина. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для матрипазы. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для цистеиновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для цистеиновой протеазы, такой как катепсин.

В некоторых вариантах осуществления СМ содержит последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28); ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 30); AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 275); TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 276); VHMLGFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 277); TSTSGRSANPRGGGVHMLGFLGP (SEQ ID NO: 278); AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 29); LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 70); VHMLGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 266); LSGRSDNHGGGVHMLGFLGP (SEQ ID NO: 267); LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 268); LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 279); ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 269); LSGRSDNHGGSGGSGNQALRMA (SEQ ID NO: 270); QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 271); LSGRSGNHGGSGGSGNQALRMA (SEQ ID NO: 272); QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 273) и/или ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 274).

В некоторых вариантах осуществления СМ1 и/или СМ2 содержит(ат) последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 5 – SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит последовательность, выбранную из группы: ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), SGRSDNI (SEQ ID NO: 100) и ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68).

В некоторых аспектах АСС содержит СР1, выбранный из SEQ ID No: 1 и 101-209, СМ1, выбранный из SEQ ID No: 5-100 и 263-308, и DD1, димеризованный с СР2, выбранным из SEQ ID No: 1 и 101-209, СМ2, выбранный из SEQ ID No: 5-100 и 263-

308, и DD2. В некоторых аспектах АСС может содержать между CP1 и CM1 и/или между CM1 и DD1 линкер, выбранный из SEQ ID No: 2 и 210-234, 245 или 250, и между CP2 и CM2 и/или между CM2 и DD2 линкер, выбранный из SEQ ID No: 2 и 210-234, 245 или 250. В некоторых вариантах осуществления АСС содержит DD1 и/или DD2, который(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична (например, на по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична) SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления АСС содержит DD1, который имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична (например, на по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична) SEQ ID NO: 315 или SEQ ID NO: 316. В некоторых вариантах осуществления АСС содержит DD2, который имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична (например, на по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична) SEQ ID NO: 315 или SEQ ID NO: 316.

Конъюгация со средствами

В настоящем изобретении также представлены способы и материалы для включения дополнительных элементов в любую из АСС, описанных в данном документе, включая, например, нацеливающий фрагмент для облегчения доставки в клетку или ткань, представляющие интерес, средства (например, терапевтического средства, противоопухолевого средства), токсина или их фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС может быть конъюгирована с цитотоксическим средством, включая без ограничения токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или

радиоактивный изотоп. В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, активируемая цитокиновая конструкция может быть конъюгирована с цитотоксическим средством, включая без ограничения токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп.

Неограничивающие примеры цитотоксических средств, которые могут быть конъюгированы с любой из АСС, описанных в данном документе, включают: доластатины и их производные (например, ауристатин Е, АРР, монометилауристатин D (ММАD), монометилауристатин F (ММАF), монометилауристатин Е (ММАЕ), десметилауристатин Е (DMAЕ), ауристатин F, десметилауристатин F (DMAF), доластатин 16 (DmJ), доластатин 16 (Dpv), производные ауристатина (например, ауристатин тирамин, ауристатин хинолон), майтансиноиды (например, DM-1, DM-4), производные майтанзиноидов, дуокармицин, альфа-аманитин, турбостатин, фенстатин, гидроксифенстатин, спонгистатин 5, спонгистатин 7, галистатин 1, галистатин 2, галистатин 3, галокомстатин, пирролобензимидазолы (PBI), цибростатин 6, доксалиформ, аналог цемадотина (CemCH₂-SH), вариант А токсина *Pseudomonase* (PES8), вариант А токсина *Pseudomonase* (ZZ-PE38), ZJ-101, антрациклин, доксорубицин, даунорубицин, бриостатин, камптотецин, 7-замещенный камптотецин, 10,11-дифторметилендиоксикамптотецин, комбретастатины, дебромоаплизиадоксин, кахамид-F, дискодермолид и эктеинасцидины.

Неограничивающие примеры ферментативно активных токсинов, которые можно конъюгировать с любой из АСС, описанных в данном документе, включают: дифтерийный токсин, цепь А экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa*, цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модеццина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки дианфина, белки *Phytolacca Americana* (например, РАРI, РАРII и РАР-8), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротины, ингибитор *Saponaia officinalis*, гейонин, митогелин, рестриктоцин, феномицин, неомицин и трикотецены.

Неограничивающие примеры противоопухолевых средств, которые могут быть конъюгированы с любой из АСС, описанных в данном документе, включают: адриамицин, церубидин, блеомицин, алкеран, велбан, онковин, фторурацил, метотрексат, тиотепа, бисантрен, новантрон, тиогуанин, прокарабизин и цитарабин.

Неограничивающие примеры противовирусных средств, которые можно конъюгировать с любой из АСС, описанных в данном документе, включают:

ацикловир, *vira A* и симметрел.

Неограничивающие примеры противогрибковых средств, которые могут быть конъюгированы с любой из АСС, описанных в данном документе, включают: нистатин.

Неограничивающие примеры реагентов для обнаружения конъюгации, которые могут быть конъюгированы с любой из АСС, описанных в данном документе, включают: флуоресцеин и его производные, изотиоцианат флуоресцеина (FITC).

Неограничивающие иллюстративные антибактериальные средства, которые могут быть конъюгированы с любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, включают: аминогликозиды, стрептомицин, неомицин, канамицин, амикацин, гентамицин и тобрамицин.

Неограничивающий иллюстративный 3-бета,16-бета,17-альфа-тригидроксихолест-5-ен-22-она 16-O-(2-O-4-метоксибензоил-бета-D-ксилопиранозил)-(1->3)-(2-O-ацетил-альфа-L-арабинопиранозид) (OSW-1), который может быть конъюгирован с любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, включает: s-нитробензилоксикарбонильные производные Об-бензилгуанина, ингибиторы топоизомеразы, гемастерлин, цефалотаксин, гомохаррингтонин, димеры пирролобензодиазепинов (PBD), функционализированные пирролобензодиазепены, кальцихеамицины, подофилитоксины, таксаны и алкоиды барвинка.

Неограничивающие иллюстративные радиофармацевтические средства, которые можно конъюгировать с любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, включают: ^{123}I , ^{89}Zr , ^{125}I , ^{131}I , ^{99}mTc , ^{201}Tl , ^{62}Cu , ^{18}F , ^{68}Ga , ^{13}N , ^{15}O , ^{38}K , ^{82}Rb , ^{111}In , ^{133}Xe , ^{11}C , и ^{99}mTc (технеций).

Неограничивающие иллюстративные тяжелые металлы, которые могут быть конъюгированы с любой из АСС, описанных в данном документе, включают: барий, золото и платину.

Неограничивающие иллюстративные антимикоплазменные средства, которые могут быть конъюгированы с любой из АСС, описанных в данном документе, включают: тилозин, спектиномицин, стрептомицин В, ампициллин, сульфаниламид, полимиксин и хлорамфеникол.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что с любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе, может быть конъюгирован ряд возможных фрагментов. Конъюгирование можно осуществить с помощью любой химической реакции, которая будет связывать две молекулы до тех

пор, пока АСС и другой фрагмент сохраняют свои соответствующие виды активности. Конъюгация может включать множество химических механизмов, например, ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексообразование. Однако в некоторых вариантах осуществления предпочтительное связывание представляет собой ковалентное связывание. Ковалентное связывание может быть достигнуто либо путем прямой конденсации существующих боковых цепей, либо путем включения внешних мостиковых молекул. Многие двухвалентные или поливалентные связывающие средства применимы для конъюгирования любой из активируемых цитокиновых конструкций, описанных в данном документе. Например, иллюстративные связующие средства могут включать органические соединения, такие как сложные тиоэфиры, карбодиимиды, сукцинимидные эфиры, диизоцианаты, глутаральдегид, диазобензолы и гексаметилендиамины. В некоторых вариантах осуществления активируемая цитокиновая конструкция может содержать или иным образом вводить один или несколько не встречающихся в природе аминокислотных остатков для получения подходящих сайтов для конъюгации.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, средство и/или конъюгат присоединяется(ются) дисульфидными связями (например, дисульфидными связями в молекуле цистеина) к антигенсвязывающему домену. Поскольку многие виды рака естественным образом высвобождают высокие уровни глутатиона, восстанавливающего средства, глутатион, присутствующий в микроокружении раковой ткани, может ослаблять дисульфидные связи и впоследствии высвобождают средство и/или конъюгат в участке доставки.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, когда конъюгат связывается со своей мишенью в присутствии комплемента в сайте-мишени (например, в пораженной ткани (например, раковой ткани)), амидная или сложноэфирная связь, прикрепляющая конъюгат и/или средство к линкеру расщепляется, что приводит к высвобождению конъюгата и/или средства в их активной форме. Эти конъюгаты и/или средства при введении субъекту будут осуществлять доставку и высвобождение конъюгата и/или средства в участке-мишени (например, пораженной ткани (например, раковой ткани)). Эти конъюгаты и/или средства особенно эффективны для доставки *in vivo* любого из конъюгатов и/или средств, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления линкер не расщепляется ферментами

системы комплемента. Например, конъюгат и/или средство высвобождается(ются) без активации комплемента, поскольку активация комплемента в конечном итоге лизирует клетку-мишень. В таких вариантах осуществления конъюгат и/или средство должен(ны) быть доставлен(ы) в клетку-мишень (например, гормоны, ферменты, кортикостероиды, нейротрансмиттеры или гены). Кроме того, линкер слабо подвержен расщеплению сывороточными протеазами, а конъюгат и/или средство высвобождается(ются) медленно на в участке-мишени.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, конъюгат и/или средство сконструирован(о)(ы) таким образом, что конъюгат и/или средство доставляется(ются) в участок-мишень (например, в пораженную ткань (например, в раковую ткань)), но конъюгат и/или средство не высвобождается(ются).

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, конъюгат и/или средство присоединен(о)(ы) к антигенсвязывающему домену либо непосредственно, либо посредством нерасщепляемого линкера. Эти нерасщепляемые линкеры могут содержать аминокислоты (например, D-аминокислоты), пептиды или другие органические соединения, которые могут быть модифицированы для включения функциональных групп, которые впоследствии могут быть использованы для присоединения к антигенсвязывающим доменам с помощью способов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС содержит по меньшей мере одну точку конъюгации средства. В некоторых вариантах осуществления все возможные точки конъюгации доступны для конъюгации со средством. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации включают без ограничения атомы серы, участвующие в дисульфидных связях, атомы серы, участвующие в межцепочечных дисульфидных связях, атомы серы, участвующие в межцепочечных сульфидных связях, но не атомы серы, участвующие во внутрицепочечных дисульфидных связях, и/или атомы серы цистеина или другие аминокислотные остатки, содержащие атом серы. Такие остатки могут естественным образом присутствовать в структуре белка или могут быть включены в белковую конструкцию с помощью методов, включая без ограничения сайт-направленный мутагенез, химическую конверсию или ошибочное включение не встречающихся в природе аминокислот.

В настоящем изобретении также представлены способы и материалы для

получения АСС для конъюгации. В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС модифицирована для включения одной или нескольких межцепочечных дисульфидных связей. Например, дисульфидные связи в АСС могут подвергаться восстановлению после воздействия восстанавливающего средства, такого как без ограничения ТСЕР, DTT или β -меркаптоэтанол. В некоторых случаях восстановление дисульфидных связей является лишь частичным. Используемый в данном документе термин частичное восстановление обозначает ситуации, когда АСС контактирует с восстанавливающим средством, и часть всех возможных сайтов конъюгации подвергается восстановлению (например, не все дисульфидные связи восстанавливаются). В некоторых вариантах осуществления активируемая цитоклиновая конструкция частично восстанавливается после контакта с восстанавливающим средством, если менее 99% (например, менее 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или менее 5%) всех возможных сайтов конъюгации восстанавливаются. В некоторых вариантах осуществления АСС, имеющая восстановление одной или нескольких межцепочечных дисульфидных связей, конъюгирована с лекарственным средством, реагирующим со свободными тиолами.

В настоящем изобретении также представлены способы и материалы для конъюгации терапевтического средства с конкретным участком на АСС. В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС модифицирована так, что терапевтические средства могут быть конъюгированы с АСС в определенных положениях на АСС. Например, АСС может быть частично восстановлена таким образом, чтобы облегчить конъюгацию с АСС. В таких случаях частичное восстановление АСС происходит таким образом, что сайты конъюгации в АСС не восстанавливаются. В некоторых вариантах осуществления сайт(ы) конъюгации на АСС выбраны для облегчения конъюгации средства в конкретном положении на белковой конструкции. На «уровень восстановления» АСС при обработке восстанавливающим средством могут влиять различные факторы. Например, без ограничения соотношение восстанавливающего средства к АСС, продолжительность инкубации, температура инкубации и/или рН восстанавливающего реакционного раствора может потребовать оптимизации для достижения частичного восстановления АСС с помощью способов и материалов, описанных в данном документе. Любая подходящая комбинация факторов (например, соотношение восстанавливающего средства к АСС, продолжительность и температура инкубации с

восстанавливающим средством и/или рН восстанавливающего средства) может быть использована для достижения частичного восстановления АСС (например, общего восстановления возможных сайтов конъюгации или восстановления в конкретных сайтах конъюгации).

Эффективным соотношением восстанавливающего средства и АСС может быть любое соотношение, при котором по меньшей мере частично восстанавливается АСС таким образом, что становится возможной конъюгация со средством (например, общее восстановление возможных сайтов конъюгации или восстановление в конкретных сайтах конъюгации). В некоторых вариантах осуществления соотношение восстанавливающего средства к АСС будет находиться в диапазоне от приблизительно 20:1 до 1:1, от приблизительно 10:1 до 1:1, от приблизительно 9:1 до 1:1, от приблизительно 8:1 до 1:1, от приблизительно 7:1 до 1:1, от приблизительно 6:1 до 1:1, от приблизительно 5:1 до 1:1, от приблизительно 4:1 до 1:1, от приблизительно 3:1 до 1:1, от приблизительно 2:1 до 1:1, от приблизительно 20:1 до 1:1,5, от приблизительно 10:1 до 1:1,5, от приблизительно 9:1 до 1:1,5, от приблизительно 8:1 до 1:1,5, от приблизительно 7:1 до 1:1,5, от приблизительно 6:1 до 1:1,5, от приблизительно 5:1 до 1:1,5, от приблизительно 4:1 до 1:1,5, от приблизительно 3:1 до 1:1,5, от приблизительно 2:1 до 1:1,5, от приблизительно 1,5:1 до 1:1,5 или от приблизительно 1:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от приблизительно 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от приблизительно 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от приблизительно 4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от приблизительно 4:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от приблизительно 8:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне от приблизительно 2,5:1 до 1:1.

Эффективным временем инкубации и температурой для обработки АСС восстанавливающим средством может быть любое время и температура, которые по меньшей мере частично восстанавливают АСС таким образом, что становится возможной конъюгация средства с АСС (например, общее восстановление возможных сайтов конъюгации или восстановление в конкретных сайтах конъюгации). В некоторых вариантах осуществления время инкубации и температура для обработки АСС будут находиться в диапазоне от приблизительно 1 часа при 37 °C до приблизительно 12 часов при 37 °C (или любых их поддиапазонах).

Эффективным рН для реакции восстановления при обработке АСС восстанавливающим средством может быть любая рН, которая по меньшей мере частично восстанавливает АСС таким образом, что становится возможной конъюгация АСС со средством (например, общее восстановление возможных сайтов конъюгации или восстановление в конкретных сайтах конъюгации).

Когда частично восстановленная АСС контактирует со средством, содержащим тиолы, средство может конъюгировать с межцепочечными тиолами в АСС. Средство можно модифицировать таким образом, чтобы оно содержало тиолы, используя тиолсодержащий реагент (например, цистеин или N-ацетилцистеин). Например, АСС может быть частично восстановлено после инкубации с восстанавливающим средством (например, ТЕРС) в течение приблизительно 1 часа при температуре приблизительно 37 °С при требуемом соотношении восстанавливающего средства к АСС. Эффективным соотношением восстанавливающего средства и АСС может быть любое соотношение, которое частично восстанавливает по меньшей мере две межцепочечные дисульфидные связи, расположенные в АСС, таким образом, что становится возможной конъюгация тиолсодержащего средства (например, общее восстановление возможных сайтов конъюгации или восстановление в конкретных сайтах конъюгации).

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС восстанавливается восстанавливающим средством таким образом, чтобы избежать восстановления каких-либо внутрицепочечных дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС восстанавливается восстанавливающим средством таким образом, чтобы избежать восстановления каких-либо внутрицепочечных дисульфидных связей, и восстанавливает по меньшей мере одну межцепочечную дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС также может содержать средство, конъюгированное с АСС. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой терапевтическое средство.

В некоторых вариантах осуществления средство (например, средство, конъюгированное с активируемой цитокиновой конструкцией) представляет собой обнаруживаемый фрагмент, такой как, например, метка или другой маркер. Например, средство представляет собой или содержит радиоактивно меченую аминокислоту, одну или несколько биотинильных групп, которые могут быть обнаружены меченым авидином (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер, или

имеющего ферментативную активность, которая может быть обнаружена оптическими или колориметрическими методами), один или несколько радиоизотопов или радионуклидов, одну или несколько флуоресцентных меток, одну или несколько ферментных меток и/или одно или несколько хемилюминесцентных средств. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемые фрагменты присоединены спейсерными молекулами.

В некоторых вариантах осуществления средство (например, цитотоксическое средство, конъюгированное с активируемой цитокиновой конструкцией) связано с АСС с помощью углеводного фрагмента, сульфгидрильной группы, аминогруппы или карбоксилатной группы.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, конъюгированной со средством, средство (например, цитотоксическое средство, конъюгированное с активируемой цитокиновой конструкцией) конъюгировано с АСС посредством линкера и/или СМ (также обозначаемого расщепляемой последовательностью). В некоторых вариантах осуществления средство (например, цитотоксическое средство, конъюгированное с активируемой цитокиновой конструкцией) конъюгировано с цистеином или лизином в АСС. В некоторых вариантах осуществления средство (например, цитотоксическое средство, конъюгированное с активируемой цитокиновой конструкцией) конъюгировано с другим остатком АСС, таким как остатки, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой тиолсодержащий линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. Неограничивающие примеры расщепляемых фрагментов и линкеров представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Типы СМ	Аминокислотная последовательность
<u>СМ плазмينا</u>	
Проурокиназа	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 280) PRFRIIGG (SEQ ID NO: 281)
TGFβ	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 282)
Плазминоген	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 283)
Стафилокиназа	SSSFDKGGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 284) SSSFDKGGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 285)

СМ фактора Ха

IEGR (SEQ ID NO: 286)

IDGR (SEQ ID NO: 287)

GGSIDGR (SEQ ID NO: 288)

СМ MMP

Желатиназа А

PLGLWA (SEQ ID NO: 289)

СМ коллагеназыКоллаген кожи телят (цепь $\alpha 1(I)$)

GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 290)

Коллаген кожи телят (цепь $\alpha 2(I)$)

GPQGLLGA (SEQ ID NO: 291)

Коллаген бычьего хряща (цепь $\alpha 1(II)$)

GIAGQ (SEQ ID NO: 292)

Коллаген печени человека (цепь $\alpha 1(III)$)

GPLGIAGI (SEQ ID NO: 293)

 α_2M человека

GPEGLRVG (SEQ ID NO: 294)

PZP человека

YGAGLGVV (SEQ ID NO: 295)

AGLGVVER (SEQ ID NO: 296)

AGLGISST (SEQ ID NO: 297)

 α_1M крысы

EPQALAMS (SEQ ID NO: 298)

QALAMSAI (SEQ ID NO: 299)

 α_2M крысы

AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 300)

MDAFLESS (SEQ ID NO: 301)

 $\alpha_1I_3(2J)$ крысы

ESLPVVAV (SEQ ID NO: 302)

 $\alpha_1I_3(27J)$ крысы

SAPAVESE (SEQ ID NO: 303)

Коллагеназа фибробластов человека

DVAQFVLT (SEQ ID NO: 304)

(аутолитические расщепления)

VAQFVLT (SEQ ID NO: 305)

VAQFVLTE (SEQ ID NO: 306)

AQFVLTEG (SEQ ID NO: 307)

PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 308)

Специалистам в данной области техники будет понятно, что ряд возможных фрагментов может быть связан с АСС по настоящему изобретению. (См., например, , “Conjugate Vaccines”, Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки). В общем, эффективная конъюгация средства (например, цитотоксического средства) с АСС может быть достигнута с помощью любой химической реакции, которая свяжет средство с АСС, а также позволит средству

и АСС сохранить функциональность.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, конъюгированных со средством, для конъюгации средства с АСС можно использовать множество бифункциональных связывающих белок средств, включая без ограничения N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиоланы (ИТ), бифункциональные производные имидоэфиров (например, диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (например, дисукцинимидилсуберат), альдегиды (например, глутаральдегид), бис-азидосоединения (например, бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (например, бис-(п-дiazонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (например, толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (например, 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин может быть получен, как описано в Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). В некоторых вариантах осуществления для конъюгации радионуклеотида с АСС можно использовать меченое углеродом-14 хелатирующее средство 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусной кислоты (MX-DTPA). (См., например, WO94/11026).

Подходящие линкеры и СМ описаны в литературе. (См., например, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984), в которой описано использование MBS (сложного эфира М-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид). См. также патент США № 5030719, в котором описано использование галогенированного производного ацетилгидразида, связанного с АСС посредством олигопептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления подходящие линкеры включают: (i) EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлорид; (ii) SMPT (4-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)-толуол (Pierce Chem. Co., кат. № 21558G); (iii) SPDP (сукцинимидил-6[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]гексаноат (Pierce Chem. Co., кат. № 21651G); (iv) сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил-6[3-(2-пиридилдитио)-пропианамид] гексаноат (Pierce Chem. Co., кат. № 2165-G); и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфо-сукцинимид: Pierce Chem. Co., кат. № 24510), конъюгированные с EDC. Дополнительные линкеры включают без ограничения SMCC, сульфо-SMCC, SPDB или сульфо-SPDB.

СМ и линкеры, описанные выше, содержат компоненты, которые имеют разные свойства, что приводит к образованию конъюгатов с разными физико-химическими свойствами. Например, сложные сульфо-NHS эфиры алкилкарбоксилатов более стабильны, чем сложные сульфо-NHS эфиры ароматических карбоксилатов. Линкеры,

содержащие сложный NHS-эфир, менее растворимы, чем содержащие сульфо-NHS эфиры. Кроме того, линкер SMPT содержит стерически затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с повышенной стабильностью. Дисульфидные связи, как правило, менее стабильны, чем другие связи, поскольку дисульфидная связь расщепляется *in vitro*, что приводит к меньшему количеству доступного конъюгата. Сульфо-NHS, в частности, может повышать стабильность сочетания с помощью карбодиимида. Сочетания с помощью карбодиимида (например, EDC) при использовании в комбинации с сульфо-NHS образуют сложные эфиры, которые более устойчивы к гидролизу, чем сложные эфир, образуемые при помощи только реакции сочетания с помощью карбодиимида.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС средство может быть конъюгировано с АСС с использованием модифицированной аминокислотной последовательности, включенной в аминокислотную последовательность АСС. Вставляя аминокислоты с возможностью конъюгации в конкретные положения в аминокислотной последовательности АСС, можно сконструировать белковую конструкцию для контролируемого размещения и/или дозировки конъюгированного средства (например, цитотоксического средства). Например, АСС можно модифицировать, включив в него аминокислотный остаток цистеина в положениях первого мономера, второго мономера, третьего мономера и/или четвертого мономера, который обеспечивает образование реакционноспособных тиоловых групп и не оказывает отрицательного влияния на укладку и/или сборку белка и не изменяет антигенсвязывающие свойства. В некоторых вариантах осуществления АСС может быть сконструирована таким образом, чтобы включать или иным образом вводить один или более не встречающихся в природе аминокислотных остатков в аминокислотную последовательность АСС для получения подходящих сайтов для конъюгации. В некоторых вариантах осуществления АСС может быть модифицирована с включением ферментативно активируемых пептидных последовательностей в аминокислотную последовательность АСС.

Нуклеиновые кислоты

В данном документе представлены нуклеиновые кислоты, содержащие последовательности, которые кодируют первую мономерную конструкцию (или белковую часть первой мономерной конструкции) (например, любую из первых мономерных конструкций, описанных в данном документе) и вторую мономерную

конструкцию (или белковую часть второй мономерной конструкции) (например, любой из вторых мономерных конструкций, описанных в данном документе) любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления пара нуклеиновых кислот совместно кодирует первую мономерную конструкцию (или белковую часть первой мономерной конструкции) и вторую мономерную конструкцию (или белковую часть второй мономерной конструкции). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первую мономерную конструкцию (или белковую часть первой мономерной конструкции), на по меньшей мере 70% идентична (например, на по меньшей мере 72% идентична, по меньшей мере 74% идентична, на меньшей мере 76% идентична, по меньшей мере 78% идентична, по меньшей мере 80% идентична, по меньшей мере 82% идентична, по меньшей мере 84% идентична, по меньшей мере 86% идентична, по меньшей мере 88% идентична, по меньшей мере 90% идентична, по меньшей мере 92% идентична, по меньшей мере 94% идентична, по меньшей мере 96% идентична, по меньшей мере 98% идентична, по меньшей мере 99% идентична или 100% идентична) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую мономерную конструкцию (или белковую часть второй мономерной конструкции).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая белковую часть первой мономерной конструкции, кодирует полипептид, содержащий фрагменты CP1 и CM1. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая белковую часть второго мономера, кодирует полипептид, содержащий фрагменты CP2 и CM2. В некоторых вариантах осуществления пара нуклеиновых кислот совместно кодирует белковую часть первой мономерной конструкции и белковую часть второй мономерной конструкции, при этом белковые части затем конъюгируют с фрагментами DD1 и DD2 соответственно (на последующем этапе конъюгации).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая первую мономерную конструкцию, кодирует полипептид, содержащий фрагмент DD1. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая вторую мономерную конструкцию, кодирует полипептид, содержащий фрагмент DD2.

Векторы

В данном документе представлены векторы и наборы векторов, содержащие любую из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе. Специалист в данной

области техники сможет выбрать подходящие векторы или наборы векторов (например, векторы экспрессии) для получения любой из АСС, описанных в данном документе, и использовать векторы или наборы векторов для экспрессии любой из АСС, описанных в данном документе. Например, при выборе вектора или набора векторов необходимо учитывать клетку, поскольку может потребоваться, чтобы вектор(ы) мог(ли) интегрироваться в хромосому клетки и/или реплицироваться в ней. Иллюстративные векторы, которые можно использовать для получения АСС, также описаны ниже.

Используемый в данном документе, термин «вектор» относится к полинуклеотиду, способному индуцировать экспрессию рекомбинантного белка (например, первого или второго мономера) в клетке (например, в любой из клеток, описанных в данном документе). «Вектор» способен доставлять нуклеиновые кислоты и их фрагменты в клетку-хозяина и включает регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер, поли(А)-сигнальную последовательность). Экзогенные полинуклеотиды могут быть вставлены в вектор экспрессии для экспрессии. Термин «вектор» также включает искусственные хромосомы, плазмиды, ретровирусы и бакуловирусные векторы.

Способы конструирования подходящих векторов, которые включают любую из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, и применимых для трансформации клеток (например, клеток млекопитающих), хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al., Eds. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, 1989 and Ausubel et al., Eds. "Current Protocols in Molecular Biology," Current Protocols, 1993.

Неограничивающие примеры векторов включают плазмиды, транспозоны, космиды и вирусные векторы (например, любые аденовирусные векторы (например, векторы pSV или pCMV), векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV), лентивирусные векторы и ретровирусные векторы) и любые векторы Gateway®. Вектор может, например, содержать достаточное количество функционирующих в *cis*-положении элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут поставляться клеткой-хозяином млекопитающего или в системе экспрессии *in vitro*. Квалифицированные специалисты смогут выбрать подходящие векторы и клетки млекопитающих для получения любой из АСС, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления любой из АСС, описанных в данном документе, АСС может быть получена биосинтетически с использованием технологии рекомбинантной ДНК и экспрессии в эукариотических или прокариотических видах.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую первый мономер и второй мономер любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления пара векторов совместно содержит пару нуклеиновых кислот, которые совместно кодируют первый мономер и второй мономер любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления пара векторов представляет собой пару векторов экспрессии.

Клетки

Также в данном документе представлены клетки-хозяева, содержащие любой из векторов или наборов векторов, описанных в данном документе, включая любую из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Любая из АСС, описанных в данном документе, может продуцироваться любой клеткой (например, клеткой млекопитающего). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего (например, клетку человека), клетку грызуна (например, клетку мыши, клетку крысы, клетку хомяка или клетку морской свинки) или клетку отличного от человека примата.

Способы введения нуклеиновых кислот и векторов (например, любого из векторов или любого из наборов векторов, описанных в данном документе) в клетку известны в данной области техники. Неограничивающие примеры способов, которые можно использовать для введения нуклеиновой кислоты в клетку, включают: липофекцию, трансфекцию, трансфекцию фосфатом кальция, трансфекцию катионным полимером, вирусную трансдукцию (например, аденовирусную трансдукцию, лентивирусную трансдукцию), трансфекцию наночастицами и электропорацию.

В некоторых вариантах осуществления этап введения включает введение в клетку вектора (например, любого из векторов или наборов векторов, описанных в данном документе), содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую мономеры, которые составляют любую из АСС, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, клетка может представлять собой эукариотическую клетку. Используемый в данном документе термин «эукариотическая клетка» обозначает клетку, имеющую отчетливое окруженное мембраной ядро. Такие клетки могут включать, например, клетки млекопитающих (например, грызунов, отличных от

человека приматов или человека), насекомых, грибов или растений. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой дрожжевую клетку, такую как *Saccharomyces cerevisiae*. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой высший эукариот, такой как клетки млекопитающих, птиц, растений или насекомых. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO) и клетки почек эмбриона человека (например, клетки HEK293).

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую первый мономер и второй мономер любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит пару нуклеиновых кислот, которые совместно кодируют первый мономер и второй мономер любой из АСС, описанных в данном документе.

Способы получения активируемых цитокиновых конструкций

В данном документе представлены способы получения любой из АСС, описанных в данном документе, которые включают: (а) культивирование любой из рекомбинантных клеток-хозяев, описанных в данном документе, в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для получения АСС; и (b) извлечение АСС из клетки-хозяина и/или жидкой культуральной среды.

Способы культивирования клеток хорошо известны в данной области техники. Клетки можно поддерживать *in vitro* в условиях, способствующих клеточной пролиферации, клеточной дифференцировке и клеточному росту. Например, клетки можно культивировать путем приведения клетки в контакт (например, любой из клеток, описанных в данном документе) со средой для культивирования клеток, которая содержит необходимые факторы роста и добавки, достаточные для поддержания жизнеспособности и роста клеток.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, способ дополнительно включает выделение извлеченной АСС. Неограничивающие примеры способов выделения включают: осаждение сульфатом аммония, осаждение полиэтиленгликолем, эксклюзионную хроматографию, лиганд-аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию (например, анионную или катионную) и хроматографию гидрофобного взаимодействия.

В некоторых вариантах осуществления клетки могут продуцировать белковую часть первой мономерной конструкции, которая содержит CP1 и CM1, и белковую

часть второй мономерной конструкции, которая содержит CP2 и CM2, а затем белковые части последовательно конъюгируют с фрагментами DD1 и DD2 соответственно.

Композиции и способы, описанные в данном документе, могут включать использование невосстанавливающих или частично восстанавливающих условий, которые позволяют образовывать дисульфидные связи между доменами димеризации для образования и поддержания димеризации АСС.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, способ дополнительно включает включение выделенной АСС в состав фармацевтической композиции. Различные составы известны в данной области и описаны в данном документе. Любая из выделенных АСС, описанных в данном документе, может быть составлена для любого пути введения (например, внутривенного, внутриопухолевого, подкожного, внутрикожного, перорального (например, ингаляционного), чрескожного (например, местного), чресслизистого или внутримышечного).

В данном документе также представлены АСС, полученные любым из способов, описанных в данном документе. Также представлены композиции (например, фармацевтические композиции), которые содержат любые АСС, полученные любым из способов, описанных в данном документе. Также в данном документе представлены наборы, которые содержат по меньшей мере одну дозу любой из композиций (например, фармацевтических композиций), описанных в данном документе.

Способы лечения

В данном документе представлены способы лечения заболевания (например, рака (например, любого из видов рака, описанных в данном документе)) у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из АСС, описанных в данном документе.

Используемый в данном документе термин «субъект» относится к любому млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления субъектом является представитель семейства кошачьих (например, кошка), псовых (например, собака), лошадиных (например, лошадь), кролик, свинья, грызун (например, мышь, крыса, хомяк или морская свинка), отличный от человека примат (например, представитель семейства обезьян (например, обезьяна (например, бабуин, мартышка) или человекообразная обезьяна (например, шимпанзе, горилла, орангутанг или гиббон)) или

человек. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления субъект ранее был идентифицирован или диагностирован, как имеющий заболевание (например, рак (например, любой из видов рака, описанных в данном документе)).

Используемый в данном документе термин «лечить» включает уменьшение тяжести, частоты или количества одного или более (например, 1, 2, 3, 4 или 5) симптомов или признаков заболевания (например, рака (например, любого из видов рака, описанных в данном документе)) у субъекта (например, у любого из субъектов, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления, когда заболевание представляет собой рак, лечение приводит к уменьшению злокачественного роста, ингибированию прогрессирования рака, ингибированию метастазирования рака или снижению риска рецидива рака у субъекта, имеющего рак.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, заболевание представляет собой рак. В данном документе также представлены способы лечения субъекта, нуждающегося в этом (например, любого из иллюстративных субъектов, описанных в данном документе или известных в данной области техники), которые включают введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из АСС, описанных в данном документе, или любой из композиций (например, фармацевтических композиций), описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления этих способов субъект был идентифицирован или диагностирован, как имеющий рак. Неограничивающие примеры рака включают: солидную опухоль, гематологическую опухоль, саркому, остеосаркому, глиобластому, нейробластому, меланому, рабдомиосаркому, саркому Юинга, остеосаркому, В-клеточные новообразования, множественную миелому, лимфому (например, В-клеточную лимфому, В-клеточную неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, кожную Т-клеточную лимфому), лейкоз (например, волосатоклеточный лейкоз, хронический лимфолейкоз (CLL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз (CML), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL)), миелодиспластические синдромы (MDS), саркому Капоши, ретинобластому, рак желудка, уротелиальную карцинома, рак легких, почечно-клеточный рак, рак желудка и пищевода, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак головного мозга, рак толстой кишки, рак костей, рак легких, рак молочной железы, колоректальный рак, рак яичников, аденокарциному носоглотки, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), плоскоклеточный рак головы и шеи, рак эндометрия, рак

мочевого пузыря, рак шейки матки, рак печени и гепатоцеллюлярную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому. В некоторых вариантах осуществления лимфома представляет собой лимфому Беркитта. В некоторых аспектах субъект идентифицирован или диагностирован, как имеющий семейные синдромы рака, такие как синдром Ли Фраумени, синдромы семейного рака молочной железы и яичников (мутации BRCA1 или BRAC2) и другие. Раскрытые способы также применимы при лечении несолидных видов рака. Примеры солидных опухолей включают злокачественные новообразования (например, саркомы, аденокарциномы и карциномы) различных систем органов, таких как опухоли легких, молочной железы, лимфоидной ткани, желудочно-кишечного тракта (например, толстой кишки) и мочеполовых путей (например, опухоли почек, уротелия или яичек), глотки, предстательной железы и яичников. Иллюстративные аденокарциномы включают колоректальный рак, почечно-клеточную карциному, рак печени, мелкоклеточную карциному легких и рак тонкой кишки.

Иллюстративные виды рака, описанные Национальным институтом рака, включают: Острый лимфобластный лейкоз взрослых; острый лимфобластный лейкоз детей; острый миелоидный лейкоз взрослых; аденокарциномы; аденокарциному детей; СПИД-ассоциированную лимфому; злокачественные новообразования, связанные со СПИДом; анальный рак; астроцитому мозжечка детей; церебральную астроцитому детей; внепеченочный рак желчных протоков; рак мочевого пузыря; рак мочевого пузыря детей; рак костей, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому; глиому ствола головного мозга детей; опухоль головного мозга взрослых; опухоль головного мозга, глиому ствола головного мозга детей; опухоль головного мозга, мозжечковую астроцитому детей; опухоль головного мозга, церебральную астроцитому/злокачественную глиому детей; опухоль головного мозга, эпендимому детей; опухоль головного мозга, медуллобластому детей; опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли детей; опухоль головного мозга, глиому зрительного пути и гипоталамуса детей; опухоль головного мозга детей (другое); рак молочной железы; рак молочной железы и беременность; рак молочной железы детей; рак молочной железы мужчин; бронхиальные аденомы/карциноиды детей; карциноидную опухоль детей; карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта; карциному коры надпочечников; карцинома островковых клеток; карциному неизвестного первичного происхождения; лимфому центральной нервной системы, первичную; мозжечковая

астроцитому детей; церебральную астроцитому/злокачественную глиому детей; рак шейки матки; различные виды рака детей; хронический лимфолейкоз; хронический миелогенный лейкоз; хронические миелопролиферативные заболевания; светлоклеточную саркому сухожильных влагалищ; рак толстой кишки; колоректальный рак детей; кожную Т-клеточную лимфому; рак эндометрия; эпендимому детей; рак эпителия яичников; рак пищевода; рак пищевода детей; семейство опухолей Юинга; экстракраниальную опухоль зародышевых клеток детей; внегонадную опухоль зародышевых клеток; рак внепеченочных желчных протоков; рак глаз, внутриглазную меланому; рак глаз, ретинобластому; рак желчного пузыря; рак желудка (пищеварительной системы); рак желудка (пищеварительной системы) детей; желудочно-кишечную карциноидную опухоль; опухоль зародышевых клеток внечерепную детей; опухоль зародышевых клеток экстрагонадную; опухоль зародышевых клеток яичников; гестационную трофобластическую опухоль; глиому ствола головного мозга детей; глиому зрительного пути и гипоталамуса детей; волосатоклеточный лейкоз; рак головы и шеи; гепатоцеллюлярный рак (печени) взрослых (первичный); гепатоцеллюлярный рак (печени) детей (первичный); лимфому Ходжкина взрослых; лимфому Ходжкина детей; лимфому Ходжкина во время беременности; гипофарингеальный рак; глиома гипоталамуса и зрительного пути детей; внутриглазную меланому; карциному островковых клеток (эндокринной части поджелудочной железы); саркому Капоши; рак почек; рак гортани; рак гортани детей; острый лимфобластный лейкоз взрослых; острый лимфобластный лейкоз детей; острый миелоидный лейкоз взрослых; острый миелоидный лейкоз детей; хронический лимфоцитарный лейкоз; хронический миелогенный лейкоз; волосатоклеточный лейкоз; рак губы и полости рта; рак печени взрослых (первичный); рак печени детей (первичный); немелкоклеточный рак легких; мелкоклеточный рак легких; острый лимфобластный лейкоз взрослых; острый лимфобластный лейкоз детей; хронический лимфоцитарный лейкоз; лимфому, связанную со СПИДом; лимфому центральной нервной системы (первичную); кожную Т-клеточную лимфому; лимфому Ходжкина взрослых; лимфому Ходжкина детей; лимфому Ходжкина во время беременности; неходжкинскую лимфому взрослых; неходжкинскую лимфому детей; неходжкинскую лимфому во время беременности; первичную лимфому центральной нервной системы; макроглобулинемию, болезнь Вальденстрема; рак молочной железы мужчин; злокачественную мезотелиому взрослых; злокачественную мезотелиому детей; злокачественную тимому; медуллобластому детей; меланому; меланому

внутриглазную; карциному клеток Меркеля; мезотелиому злокачественную; метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным поражением; синдром множественной эндокринной неоплазии детей; множественную миелому/новообразование плазматических клеток; грибовидный микоз; миелодиспластические синдромы; хронический миелогенный лейкоз; острый миелоидный лейкоз детей; множественную миелому; хронические миелопролиферативные заболевания; рак полости носа и околоносовых пазух; рак носоглотки; рак носоглотки детей; нейробластому; неходжкинскую лимфому взрослых; неходжкинскую лимфому детей; неходжкинскую лимфому во время беременности; мелкоклеточный рак легких; рак полости рта детей; рак полости рта и губы; рак ротоглотки; остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому костей; рак яичников детей; рак эпителия яичников; опухоль зародышевых клеток яичников; опухоль яичников с низким злокачественным потенциалом; рак поджелудочной железы; рак поджелудочной железы детей; рак островковых клеток поджелудочной железы; рак околоносовых пазух и полости носа; рак паращитовидной железы; рак полового члена; феохромоцитому; пинеальные и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли детей; опухоль гипофиза; новообразование плазматических клеток/множественную миелому; плевропульмональную бластому; беременность и рак молочной железы; беременность и лимфому Ходжкина; беременность и неходжкинскую лимфому; первичную лимфому центральной нервной системы; первичный рак печени взрослых; первичный рак печени детей; рак предстательной железы; рак прямой кишки; почечно-клеточный рак (почек); почечно-клеточный рак детей; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; ретинобластому; рабдомиосаркому детей; рак слюнных желез; рак слюнных желез детей; саркому семейства опухолей Юинга; саркому Капоши; саркому (остеосаркому)/злокачественную фиброзную гистиоцитому костей; саркому, рабдомиосаркому детей; саркому мягких тканей взрослых; саркому мягких тканей детей; синдром Сезари; рак кожи; рак кожи детей; рак кожи (меланому); карциному клеток кожи Меркеля; мелкоклеточный рак легких; рак тонкой кишки; саркому мягких тканей взрослых; саркому мягких тканей детей; метастатический первичный плоскоклеточный рак шеи неизвестного происхождения; рак желудка (пищеварительной системы); рак желудка (пищеварительной системы) детей; супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли детей; Т-клеточную лимфому кожи; рак яичек; тимому детей; злокачественную тимому; рак щитовидной

железы; рак щитовидной железы детей; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; гестационную трофобластическую опухоль; рак неизвестной первичной локализации детей; необычные виды рака детей; переходно-клеточный рак мочеточника и почечной лоханки; рак уретры; саркому матки; вагинальный рак; глиому зрительного пути и гипоталамуса детей; рак вульвы; макроглобулинемию Вальденстрема; и опухоль Вильмса.

Другие иллюстративные виды рака включают диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) и лимфому из клеток мантийной зоны (MCL).

Метастазы вышеупомянутых видов рака также можно лечить или предупреждать в соответствии со способами, описанными в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления эти способы могут приводить к уменьшению количества, тяжести или частоты одного или нескольких симптомов рака у субъекта (например, по сравнению с количеством, тяжестью или частотой одного или нескольких симптомов рака у субъекта до лечения).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, способы дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства (например, одного или нескольких терапевтических средств, перечисленных в таблице 2).

Таблица 2. Дополнительные терапевтические средства

Торговое название антитела (название антитела)	Мишень
Raptiva™ (эфализумаб)	CD11a
Arzerra™ (офатумумаб)	CD20
Bexhar™ (тозитумомаб)	CD20
Gazyva™ (обинутузумаб)	CD20
Ocrevus™ (окрелизумаб)	CD20
Rituxan™ (ритуксимаб)	CD20
Zevalin™ (ибритумомаб тиуксетан)	CD20
Adcetris™ (брентуксимаб ведотин)	CD30
Myelotarg™ (гемтузумаб)	CD33
Mylotarg™ (гемтузумаб озогамин)	CD33
(вадастуксимаб)	CD33

(вадастуксимаб талирин)	CD33
Campath™ (алемтузумаб)	CD52
Lemtrada™ (алемтузумаб)	CD52
Tactress™ (тамтуветмаб)	CD52
Soliris™ (экулизумаб)	Фактор C5 системы комплемента
Ultomiris™ (равулизумаб)	Фактор C5 системы комплемента
(олендализумаб)	Фактор C5 системы комплемента
Yervoy™ (ипилимумаб)	CTLA-4
(тремелимумаб)	CTLA-4
Orencia™ (абатацепт)	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(летолизумаб)	CD40L
Rexomun™ (эртумаксумаб)	CD3/Her2
Erbitux™ (цетуксимаб)	EGFR
Portrazza™ (нецитумумаб)	EGFR
Vectibix™ (панитумумаб)	EGFR
CH806	EGFR
(депатуксизумаб)	EGFR
(депатуксизумаб мафодотин)	EGFR
(футуксимаб:модотуксимаб)	EGFR
ICR62 (имгатузумаб)	EGFR
(лапритуксимаб)	EGFR
(лосатуксизумаб)	EGFR
(лосатуксизумаб ведотин)	EGFR
mAb 528	EGFR
(матузумаб)	EGFR
(нимотузумаб)	EGFR
(томузотуксимаб)	EGFR
(залутумумаб)	EGFR
MDX-447	EGFR/CD64
(адекватумумаб)	EpCAM
Panorex™ (эдреколомаб)	EpCAM
Vicinium™	EpCAM

Synagis™ (паливизумаб)	F-белок РСВ
ReoPro™ (абциксимаб)	Гликопротеиновые рецепторы IIb/IIIa
Herceptin™ (трастузумаб)	Her2
Herceptin™ Hylecta (трастузумаб; гиалуронидаза)	Her2
(трастузумаб дерукстекан)	Her2
(гертузумаб вердотин)	Her2
Kadcyla™ (трастузумаб эмтанзин)	Her2
(маргетуксимаб)	Her2
(тимигутузумаб)	Her2
Xolair™ (омализумаб)	IgE
(лигелизумаб)	IgE
(фигитумумаб)	IGF1R
(тепротумумаб)	IGF1R
Simulect™ (базиликсимаб)	IL2R
Zenarax™ (даклизумаб)	IL2R
Zinbryta™ (даклизумаб)	IL2R
Actemra™ (тоцилизумаб)	Рецептор IL-6
Kevzara™ (сарилумаб)	Рецептор IL-6
(вобарилизумаб)	Рецептор IL-6
Stelara™ (устекинумаб)	IL-12/IL-23
Tysabri™ (натализумаб)	Интегрин α4
(абрилумаб)	Интегрин α4
	Jagged 1 или Jagged 2
(фасинумаб)	NGF
(фулранумаб)	NGF
(танезумаб)	NGF
	Notch, например, Notch 1
пидилизумаб	Дельта-подобный-1 белок (ингибитор пути PD-1)
Opdivo® (ниволумаб)	PD1
Keytruda® (пембролизумаб)	PD1

Libtayo® (цемиплимаб)	PD1
BGB-A317 (тислелизумаб)	PD1
PDR001 (спартализумаб)	PD1
JNJ-63723283 (цетрелимаб)	PD1
TSR042 (достарлимаб)	PD1
AGEN2034 (балстилимаб)	PD1
JS001 (торипалимаб)	PD1
IOB1308 (синтилимаб)	PD1
BCD100 (пролголимаб)	PD1
CBT-501 (генолимзумаб)	PD1
ABBV181 (будигалимаб)	PD1
AK105	PD1
BI-754091	PD1
INCSHR-1210	PD1
MEDI0680	PD1
MGA012	PD1
SHR-1210	PD1
Imfinzi™ (дурвалумаб)	PD-L1
Tecentriq® (атезолизумаб)	PD-L1
Bavencio® (авелумаб)	PD-L1
KN035 (энвафолимаб)	PD-L1
BMS936559 (MDX1105)	PD-L1
BGBA 333	PD-L1
FAZ053	PD-L1
LY-3300054	PD-L1
SH-1316	PD-L1
AMP-224	PD-L2
(бавитуксимаб)	Фосфатидилсерин
huJ591	PSMA
RAV12	RAAG12
Prolia™ (деносумаб)	RANKL
GC1008 (фрезолимумаб)	TGF-бета
Cimzia™ (сертолизумаб пэгол)	TNF α

Remicade™ (инфликсимаб)	TNF α
Humira™ (адалимумаб)	TNF α
Simponi™ (голимумаб)	TNF α
Enbrel™ (этанерцепт)	TNF-R
(мапатумумаб)	TRAIL-R1
Avastin™ (бевацизумаб)	VEGF
Lucentis™ (ранибизумаб)	VEGF
(бролуцизумаб)	VEGF
(вануцизумаб)	VEGF

Композиции/наборы

В данном документе также представлены композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие любую из АСС, описанных в данном документе, и один или несколько (например, 1, 2, 3, 4 или 5) фармацевтически приемлемых носителей (например, любой из фармацевтически приемлемых носителей, описанных в данном документе), разбавители или вспомогательные вещества.

В некоторых вариантах осуществления композиции (например, фармацевтические композиции), которые содержат любую из АСС, описанных в данном документе, могут быть помещены в стерильный флакон или предварительно заполненный шприц.

В некоторых вариантах осуществления композиции (например, фармацевтические композиции), которые содержат любую из АСС, описанных в данном документе, могут быть составлены для различных путей введения (например, внутривенного, подкожного, внутримышечного, внутрибрюшинного или внутриопухолевого).

В некоторых вариантах осуществления любая из фармацевтических композиций, описанных в данном документе, может содержать один или несколько буферов (например, нейтральный солевой буфер, фосфатно-солевой буфер (PBS), аминокислоты (например, глицин), один или несколько углеводов (например, глюкозу, маннозу, сахарозу, декстран или маннит), один или несколько антиоксидантов, один или несколько хелатирующих средств (например, EDTA или глутатион), один или несколько консервантов и/или фармацевтически приемлемый носитель (например, бактериостатическую воду, PBS или физиологический раствор).

Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый

носитель» предназначен для включения любых и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических и задерживающие абсорбцию средств и т.п., совместимых с фармацевтическим введением. Подходящие примеры таких носителей или разбавителей включают без ограничения воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека.

В некоторых вариантах осуществления любой из фармацевтических композиций, описанных в данном документе, любую из АСС, описанных в данном документе, получают с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфир и полимолочная кислота. Специалистам в данной области техники будут очевидны способы получения таких составов.

Также в данном документе предусмотрены наборы, которые содержат любую из АСС, описанных в данном документе, любую из композиций, которые содержат любую из АСС, описанных в данном документе, или любую из фармацевтических композиций, которые содержат любую из АСС, описанных в данном документе. Также представлены наборы, которые содержат один или несколько вторых терапевтических средств, выбранных из таблицы 2, в дополнение к АСС, описанной в данном документе. Второе(ые) терапевтическое(ие) средство(а) может(гут) быть предоставлено(ы) в лекарственной форме для введения, которая отделена от АСС. В качестве альтернативы второе(ые) терапевтическое(ие) средство(а) может(гут) быть составлено(ы) совместно с АСС.

Любой из наборов, описанных в данном документе, может содержать инструкции по применению любой из композиций (например, фармацевтических композиций) и/или любой из АСС, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать инструкции по выполнению любого из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать по меньшей мере одну дозу любой из композиций (например, фармацевтических композиций), описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать шприц для введения любой из фармацевтических композиций, описанных в данном документе.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение далее дополнительно в следующих примерах, которые не ограничивают объем настоящего изобретения, описанный в формуле изобретения.

Пример 1: Получение активируемых цитокиновых конструкций

Активируемую цитокиновую конструкцию IFN- α 2b-1204DNI_{Idl}-hIgG4 получали рекомбинантными методами. 1^{-я} и 2^{-я} мономерные конструкции этой АСС были идентичны, причем каждая из них представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, показанную на фигуре 3 (SEQ ID NO:309). Каждая из 1^{-й} и 2^{-й} мономерных конструкций содержит от N-конца к С-концу сигнальную последовательность из сигнальной последовательности IgG каппа мыши (остатки 1-20 SEQ ID NO:309), зрелый цитокиновый белок, который соответствует интерферону альфа-2b человека (SEQ ID NO: 1), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, линкер, имеющий аминокислотную последовательность GGGS (SEQ ID NO: 2), и DD, соответствующий Fc IgG человека (SEQ ID NO: 4). Полипептид получали путем трансформации клетки-хозяина полинуклеотидом, имеющим последовательность SEQ ID NO: 310, с последующим культивированием полученных рекомбинантных клеток-хозяев. Димеризация полученных экспрессированных полипептидов приводила к образованию активируемой цитокиновой конструкции, IFN- α 2b 1204DNI_{Idl} hIgG4.

Активируемую цитокиновую конструкцию IFN- α -2b 1490DNI-hIgG4 также получали рекомбинантными методами. 1^{-я} и 2^{-я} мономерные конструкции этой АСС также были идентичны, причем каждая из них представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, показанную на фигуре 4 (SEQ ID NO:311). Каждая из 1^{-й} и 2^{-й} мономерных конструкций этой АСС содержит от N-конца к С-концу сигнальную последовательность из сигнальной последовательности IgG каппа мыши (остатки 1-20 SEQ ID NO:309), зрелый цитокиновый белок, который соответствует интерферону альфа-2b человека (SEQ ID NO: 1), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, линкер, имеющий аминокислотную последовательность GGGS (SEQ ID NO: 2), и DD, соответствующий Fc IgG человека (SEQ ID NO: 4). Полипептид получали путем трансформации клетки-хозяина полинуклеотидом, имеющим последовательность SEQ ID NO: 312, с последующим культивированием полученных рекомбинантных клеток-хозяев. Димеризация полученных экспрессированных полипептидов приводила к

образованию активируемой цитокиновой конструкции, IFN- α 2b 1204dl hIgG4.

Получали дополнительные активируемые цитокиновые конструкции, которые содержали дополнительные пять аминокислотных остатков в линкерах.

Электрофорез проводили на активируемых цитокиновых конструкциях и обработанных протеазой активируемых цитокиновых конструкциях. На фигуре 6 изображен гель, на котором показаны результаты для (слева направо): (1) ACC IFN- α 2b-1204DNI-dl-hIgG4 («1204»); (2) IFN- α 2b-1204DNI-dl-hIgG4, обработанной MT-SP1 («1204 MT-SP1»); (3) обработанный uPA IFN- α 2b-1204DNI-dl-hIgG4 («1204 uPA»); (4) IFN- α 2b-1204DNI-dl-hIgG4 с пятью аминокислотными остатками, добавленными к линкеру («1204+1»); (5) обработанный MT-SP1 IFN- α 2b-1204DNI-dl-hIgG4 («1204+1 MT-SP1»); (6) IFN- α 2b-1204DNI-dl-hIgG4, обработанный uPA («1204+1 uPA»); (7) IFN- α -2b 1490DNI-hIgG4 («1490»); (8) обработанный MT-SP1 IFN- α -2b 1490DNI-hIgG4 («1490 MT-SP1»); и (9) обработанный uPA IFN- α -2b 1490DNI-hIgG4 («1490 uPA»). Результаты позволяют предположить, что протеазы были эффективны при расщеплении расщепляемых фрагментов в активируемых цитокиновых конструкциях.

Пример 2. Активность IFN-альфа-2b активируемых цитокиновых конструкций

Для тестирования активности ACC, описанных в примере 1, использовали клеточный репортерный анализ интерферонов типа I человека.

Клетки HEK293, отвечающие на IFN, получали путем стабильной трансфекции генами STAT2 и IRF9 человека с получением полностью активного сигнального пути IFN I типа. Клетки также имеют индуцируемый репортерный ген SEAP (секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза), находящийся под контролем индуцируемого IFN α/β промотора ISG54. Для поддержания экспрессии трансгена клетки культивировали в среде DMEM GlutaMax с добавлением 10% FBS, пенициллина/стрептомицина, 30мкг/мл бластицидина, 100 мкг/мл зеоцина и 100 мкг/мл нормоцина. Добавление IFN I типа к этим клеткам активирует путь JAK/STAT/ISGF3 и впоследствии индуцирует выработку SEAP, которую можно легко оценить в супернатанте с помощью раствора Quanti-Blue, колориметрического определения активности щелочной фосфатазы. Используя этот репортерный анализ, активность содержащих IFN α -2b ACC, сравнивали с активностью Sylatron® (пегинтерферон альфа-2b). Данные на фигуре 7 показывают, что активность IFN α -2b ACC была значительно снижена по сравнению с активностью IFN α -2b Sylatron® (пегинтерферон альфа-2b).

Кроме того, данные на фигурах 8A и 8B показывают, что активность

(нерасщепленных) АСС можно модулировать, изменяя длину линкера или связывающей области. Данные на фигуре 8А-8В показывают результаты слитых конструкций IFN α -2b-hIgG4 Fc с различной длиной линкера или без линкера между IFN α -2b и hIgG4 Fc, как тестировали в репортерном анализе HEK293. Слитые белки, тестируемые в этом эксперименте, содержат в направлении от N- к С-концу последовательность зрелого цитокина IFN-альфа-2b, необязательный линкер и/или расщепляемый фрагмент и домен Fc IgG4 человека SEQ ID NO: 4 (включая полную шарнирную область, так что N-конец последовательности Fc начинается с аминокислотной последовательности ESKYGPPCPPC...). Первая конструкция (связывающая область = 7) не имеет линкера или расщепляемого фрагмента; ее последовательность в направлении от N- к С-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 4. Вторая конструкция (связывающая область = 12) имеет линкер из 5 аминокислот SGGGG (SEQ ID NO: 335); ее последовательность в направлении от N- к С-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 335, слитой с SEQ ID NO: 4. Третья конструкция (связывающая область = 18) содержит CM из 7 аминокислот (SGRSDNI) и линкер GGGS из 4 аминокислот; ее последовательность в направлении от N- к С-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 100, слитой с SEQ ID NO: 2, слитой с SEQ ID NO: 4. Четвертая конструкция (связывающая область = 23) содержит линкер из 5 аминокислот, CM из 7 аминокислот и линкер из 4 аминокислот; ее последовательность в направлении от N-конца к С-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 335, слитой с SEQ ID NO: 100, слитой с SEQ ID NO: 2, слитой с SEQ ID NO: 4. Пятая конструкция (связывающая область = 24) содержит CM из 13 аминокислот (ISSGLLSGRSDNI) и линкер из 4 аминокислот; ее последовательность в направлении от N- к С-концу состоит из SEQ ID NO: 1, слитой с SEQ ID NO: 68, слитой с SEQ ID NO: 2, слитой с SEQ ID NO: 4.

Пример 3: Антипролиферативный эффект АСС *in vitro* в отношении раковых клеток

Антипролиферативные эффекты IFN α -2b и АСС, содержащих IFN α -2b, тестировали *in vitro* с использованием клеток Daudi, клеточной линии В-клеточного лимфобластного происхождения человека. Клетки Daudi готовили в концентрации 2×10^5 клеток/мл в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS и аликвоты по 50 мкл пипетировали в лунки белого плоскодонного 96-луночного планшета (10 тыс./лунка). Тестируемые АСС или контроли разводили в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS. Готовили повторные пятикратные серийные разведения, из которых в каждую лунку

добавляли по 50 мкл. После 3 дней инкубации при 37 °C использовали набор для определения жизнеспособности для измерения уровней внутриклеточного АТФ в качестве косвенной оценки количества оставшихся жизнеспособных клеток. 100 мкл клеточного титра добавляли непосредственно в планшеты, которые затем помещали на орбитальный шейкер на 10 минут. После этой инкубации непосредственно измеряли люминесцентный сигнал с помощью планшетного ридера Envision. Строили кривые доза-ответ, и значения EC50 получали с помощью сигмоидальной аппроксимации нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism. Специфическую активность определяли путем сравнения значений EC50 с рекомбинантным IFN α 2b или Sylatron® фармацевтического качества (пегинтерферон альфа-2b).

Антипролиферативная активность IFN α -2b-содержащих АСС в клетках лимфомы Daudi указывала на то, что активность IFN α -2b нерасщепленных АСС была снижена по сравнению с Sylatron® (пегинтерферон альфа-2b) (Фиг. 9).

Данные на Фиг. 10А-10В также показывают, что активность (нерасщепленных) АСС можно модулировать, изменяя длину линкера. Антипролиферативные эффекты конструкций слитых белков IFN α -2b-hIgG4 Fc с различной длиной линкера или без линкера между IFN α -2b и hIgG4 Fc тестировали *in vitro* с использованием клеток Daudi. Данные показывают, что длина гибких линкеров и длина связывающей области (LR) между цитокином и Fc-доменом оказывали влияние на активность (нерасщепленных) АСС. Конструкции с нулевыми линкерами или короткими линкерами и соответственно короткой LR демонстрируют сниженную цитокиновую активность, тогда как конструкции с более длинными линкерами, и следовательно, более длинной LR имеют более высокий уровень цитокиновой активности. Результаты проиллюстрированы на фигурах 10А-10В. Конструкции слитых белков такие же, как описанные выше в примере 2 в отношении фигур 8А и 8В.

Пример 4: Активность обработанных протеазой АСС

Обработанные протеазой содержащие IFN α -2b АСС тестировали в отношении антипролиферативных ответов в клетках лимфомы Daudi и в клеточном репортерном анализе, чтобы определить, можно ли восстановить активность.

Для расщепления димеризующегося домена содержащие IFN α -2b АСС обрабатывали в течение ночи при 37°C рекомбинантными человеческими протеазами, такими как активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) или матриптаза (MT-SP1). Смесь ингибиторов протеаз добавляли для нейтрализации протеаз перед

тестированием в отношении активности, как описано в примерах 2 и 3. Результаты этих анализов показывают, что обработка IFN α -2b-содержащих ACC протеазами может восстановить активность до уровня, который является сопоставимым с рекомбинантным цитокином. Значения EC50 для ACC IFN α -2b-1204DNIIdl-hIgG4, ACC IFN α -2b-1204DNIIdl-hIgG4 + uPA и IFN α -2b стволовых клеток (рекомбинантный IFN-альфа 2b человека, доступный от StemCell Technologies, кат. № 78077.1) рассчитывали по результатам анализа апоптоза клеток Daudi и представлены ниже в таблице 3.

Таблица 3. EC50: Анализ апоптоза клеток Daudi

	IFN α -2b- 1204DNIIdl-hIgG4 (ACC)	IFN α -2b- 1204DNIIdl-hIgG4 (ACC) + uPA	IFN α -2b стволовых клеток
EC50	131,8	0,5701	0,3664

Значения EC50 для ACC IFN α -2b-1204DNIIdl-hIgG4, ACC IFN α -2b-1204DNIIdl-hIgG4 + uPA и IFN α -2b стволовых клеток рассчитывали из результатов анализа IFN α /□ и представляли ниже в таблице 4.

Таблица 4. EC50: репортерный анализ IFN α /□

	IFN α -2b- 1204DNIIdl- hIgG4 (ACC)	IFN α -2b- 1204DNIIdl- hIgG4 (ACC) + uPA	Sylatron [®]	Коммерческий IFN α -2b
EC50	393,1	0,4611	3,019	1,280

Эти результаты показывают, что без присутствия активирующей протеазы активность IFN α -2b-1204DNIIdl-hIgG4 значительно снижается по сравнению с контролем IFN α -2b.

Пример 5: Универсальный ProIFN

ACC в соответствии с настоящим изобретением получали рекомбинантными методами, имея универсальную последовательность интерферона (ProC859) (IFN α AD 0AA 1204DNIIdL 0AA IgG4), обладающую активностью в отношении клеток как человека, так и мыши. 1^{-я} и 2^{-я} мономерные конструкции этой ACC были идентичными, каждая из которых представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 323 и сигнальную последовательность на его N-конце). Каждая из 1^{-й} и 2^{-й} мономерных конструкций содержит, от N-конца к С-концу, сигнальную последовательность, зрелый цитокиновый белок, который соответствует

универсальной молекуле интерферона, представляющей собой гибрид IFN альфа 1 и IFN альфа 2a (SEQ ID NO: 324), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и домен димеризации, соответствующий Fc IgG человека (SEQ ID NO: 3). Активность универсального ProIFN тестировали *in vitro* с использованием отвечающих на IFN клеток HEK293 и клеток меланомы мыши B16.

Активность ProC859 была снижена в по меньшей мере 150 раз по сравнению с IFN α 4 мыши. Активация протеазы с помощью uPA восстанавливала активность до уровня, сопоставимого с IFN α 4 мыши, как показано на фигуре 19). Значения EC50 для ACC ProC859, ACC ProC859 + uPA и IFN α 4 мыши рассчитывали по результатам анализа и представляли на фигуре 19.

EC50: Репортерный анализ B16 IFN α /□

	ProC859 (ACC)	ProC859 (ACC) + uPA	IFN α 4
EC50	293,7	1,951	1,966

Пример 6: In vitro характеристика ведущей ACC ProC440:

Активируемую цитокиновую конструкцию ProC 440 (N IFN α 2b 0 1204DNIdL 0AA Fc) также получали рекомбинантными методами. 1^{-я} и 2^{-я} мономерные конструкции этой ACC были идентичны, причем каждая из них представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 313 и сигнальную последовательность на своем N-конце. Каждая из 1^{-й} и 2^{-й} мономерных конструкций содержат, от N-конца к C-концу, сигнальную последовательность, зрелый цитокиновый белок, который соответствует интерферону альфа-2b человека (SEQ ID NO: 1), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и домен димеризации, соответствующий Fc IgG человека (SEQ ID NO: 3).

Активность ProC440 тестировали *in vitro* с использованием отвечающих на IFN клеток HEK293 и клеток Daudi, как описано ранее. В обоих анализах активность ProC440 была снижена в по меньшей мере 1000 раз по сравнению с IFN α -2b стволовых клеток (фигура 13). Активация протеазы с помощью uPA восстанавливала активность до уровня, сопоставимого с активностью рекомбинантного цитокина (IFN α 2b, как показано на фигуре 13). Значения EC50 для ACC ProC440, ACC ProC440 + uPA и IFN α -2b стволовых клеток рассчитывали из результатов анализа IFN α /□ и представляли ниже в таблице 5.

Таблица 5. EC50: Репортерный анализ IFN α /□

	ProC440 (ACC)	ProC440 (ACC) + uPA	IFN α -2b стволовых клеток
EC50	7643	4,333	10,88

Значения EC50 для ACC ProC440, ACC ProC440 + uPA и IFN α -2b стволовых клеток рассчитывали из результатов анализа апоптоза клеток Daudi и представляли ниже в таблице 6.

Таблица 6. EC50: Анализ апоптоза клеток Daudi

	ProC440 (ACC)	ProC440 (ACC) + uPA	IFN α -2b стволовых клеток
EC50	264,2	0,1842	0,3530

Расщепление uPa в ожидаемом сайте в СМ подтверждали масс-спектрометрическим анализом (фигуры 14А-14В). Помимо чувствительности к активации uPa, ProC440 расщепляется MMP4 (фигуры 14А-14В). Анализ с помощью масс-спектрометрии идентифицировал сайт расщепления MMP14 на С-конце IFN α , рядом с расщепляемым фрагментом (фигуры 14В). Активация протеазы с помощью MMP14 восстанавливала активность до уровня, сопоставимого с активностью рекомбинантного цитокина. Все вместе это указывает на то, что ACC ProC440 может восстанавливать полную активность после расщепления внутренних и сконструированных расщепляемых фрагментов с помощью по меньшей мере uPa и MMP14.

ACC ProC657 (N IFN α 2b 0AA 1204DNI dL 0AA IgG4 KiHSS) также получали рекомбинантными методами. 1^{-я} мономерная конструкция этой ACC представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314 и сигнальную последовательность на своем N-конце. 1^{-я} мономерная конструкция этой ACC содержит, от N-конца к С-концу, сигнальную последовательность, зрелый цитокиновый белок, который соответствует интерферону альфа-2b человека (SEQ ID NO: 1), расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, и домен димеризации, соответствующий Fc IgG человека с мутацией типа выступа (SEQ ID NO: 315). 2^{-я} мономерная конструкция этой ACC представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 322 и сигнальную последовательность на своем N-конце. 2^{-я} мономерная конструкция имеет, от N-конца к С-концу, сигнальную последовательность, фрагмент отрезка (SEQ ID NO: 317) и домен димеризации, соответствующий Fc IgG человека с мутацией типа впадина

(SEQ ID NO : 316).

Активность ProC657 тестировали *in vitro* с использованием отвечающих на IFN клеток HEK293, как описано ранее. Активность ProC657 была снижена по сравнению с IFN α -2b стволовых клеток или активированной uPa ProC440, но повышена по сравнению с ProC440 (фигура 15). Таким образом, в настоящем изобретении представлены различные структуры ACC, которые позволяют модулировать уровни снижения активности в ACC.

Пример 7: Антипролиферативная активность ACC *in vivo*:

Антипролиферативные эффекты содержащей IFN α -2b ACC ProC440 тестировали *in vivo* с использованием модели ксенотрансплантата опухоли клеток Daudi. Мышам Beige/SCID подкожно имплантировали 10×10^6 клеток Daudi в бессывороточной среде (1:1 матригель). Когда средний объем опухоли достигал ~ 60 - 120 мм³, мышей рандомизировали и один раз в неделю в течение 5 недель им вводили ProC440. Массу тела и размеры опухоли регистрировали два раза в неделю на протяжении всего исследования. Данные на фигуре 16 показывают, что содержащая IFN α -2b ACC ProC440 индуцировала полную регрессию опухоли при такой низкой дозе, как 0,1 мг/кг и замедление роста опухоли в дозе 0,02 (вверху), а антипролиферативные эффекты Sylatron® показаны для сравнения (внизу).

Пример 8: Переносимость ACC *in vivo*

IFN α -2b человека перекрестно реагирует с рецептором IFN α хомячка, и ранее было показано, что он активен у хомячков (Altrock et al., Journal of Interferon Research, 1986). Для оценки переносимости содержащей IFN α -2b ACC ProC440 сирийским золотым хомячкам вводили начальную дозу 0,4 мг/кг. Животные получали одну дозу тестируемого препарата и оставались в исследовании до 7 дней после введения дозы, если только не была выявлена непереносимая токсичность (DLT означает дозоограничивающую токсичность). Начальная доза (0,4 мг/кг («мг/кг»)) представляет собой эквивалентную дозу INF α -con (рекомбинантный интерферон альфа, не встречающийся в природе интерферон типа I, производимый Amgen под названием Infergen®), который, как ожидается, вызовет потерю массы тела, снижение потребления пищи и угнетение костного мозга у хомячка (125 гр). (У яванского макака 0,1 мг/кг/день INF α -con ассоциировался с потерей массы тела, снижением потребления пищи и угнетением функции костного мозга (равно $1,25$ - $2,5 \times 10^7$ Ед для 125-граммового хомяка).) Если начальная доза переносилась, животных переводили на «среднюю дозу» 2 мг/кг и получали три дозы тестируемого препарата до тех пор, пока

он не переносился. При переносимости животных переводили на «высокую дозу» 10 мг/кг и получил три дозы тестируемого препарата до тех пор, пока он не переносился. При переносимости животных переводили на «более высокую дозу» 15 мг/кг. На каждом этапе, если тестируемая доза не переносилась, животное переводили на следующую меньшую дозу. Если начальная доза не переносилась, животное переводили на «более низкую дозу» 0,08 мг/кг. Животным вводили АСС, имеющие от N- до C-конца структуру димеров DD-CM-CP (ProC286). В качестве отрицательного контроля животным вводили IgG4 человека. Отрицательный контроль не вызывал никакой токсичности у животных, как и ожидалось.

ProC286 (ChIgG4 5AA 1204DNIIdL IFNa2b) также получали рекомбинантными методами. 1^{-я} и 2^{-я} мономерные конструкции были идентичны, причем каждая из них представляла собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 320 и сигнальную последовательность на своем N-конце. Каждая из 1^{-й} и 2^{-й} мономерных конструкций содержат, от N-конца к C-концу, сигнальную последовательность, домен димеризации, соответствующий Fc IgG человека (SEQ ID NO: 3), линкер (SEQ ID NO: 321) расщепляемый фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, линкер (SEQ ID NO: 2), и зрелый цитокиновый белок, соответствующий интерферону альфа-2b человека (SEQ ID NO: 1).

ProC291 (NhIgG4 5AA 1204DNIIdL IFNa2b) также получали рекомбинантными методами. 1^{-я} и 2^{-я} мономерные конструкции были идентичными. Каждая из 1^{-й} и 2^{-й} мономерных конструкций содержит, от N-конца к C-концу, зрелый цитокиновый белок, который соответствует интерферону альфа-2b человека (SEQ ID NO: 1), линкер (SEQ ID NO: 321), CM (SEQ ID NO: 100), линкер (GGGS) и Fc-область IgG4 человека, включая полную шарнирную последовательность (SEQ ID NO: 4).

Активность ProC286 и ProC291 сравнивали с активностью Sylatron® (PEG-IFN-alpha2b) в анализе апоптоза клеток Daudi (фигуры 17A-17B). В этом анализе ProC286 и Sylatron® показали аналогичные уровни активности, как показано на фигуре 17A. Это указывает на то, что ProC286 имеет активность, аналогичную коммерчески доступному пегилированному IFN-alpha2b, и может использоваться в качестве суррогатного контроля Sylatron® для оценки переносимости IFN α -2b в исследовании у хомячка. ProC291 показал сниженную активность по сравнению с ProC286 и Sylatron®, что указывает на то, что структурная ориентация N-конца IFN по отношению к Fc важна для снижения активности. То есть, когда DD представляет собой пару Fc-доменов, расположение цитокина на N-конце по отношению к DD (как в ProC291) может

обеспечить большее снижение цитокиновой активности, чем когда цитокин расположен на С-конце по отношению к DD (как в ProC286).

В день 1 животным вводили 0,4 мг/кг начальной дозы. Животных оставляли в исследовании в течение одной недели, если не достигалась непереносимая доза (DLT). Клинические наблюдения, массу тела и температуру измеряли перед введением дозы и через 6 часов, 24 часа, 72 часа и 7 дней после введения дозы для каждого животного. Образцы крови для анализа крови и биохимического анализа крови собирали через 72 часа, 7 дней после введения дозы для каждого животного. Анализ крови и биохимический анализ крови выполняли непосредственно после взятия образца. Для анализа крови определяли: мазок крови, дифференциальный подсчет лейкоцитов, гематокрит, гемоглобин, средний корпускулярный гемоглобин, средний корпускулярный объем, количество тромбоцитов, количество красных кровяных телец (эритроцитов), ширину распределения эритроцитов, количество ретикулоцитов и количество белых кровяных телец (лейкоцитов). Панель клинической химии включала измерение аланинаминотрансферазы, альбумина, соотношения альбумин/глобулин, алкалинфосфатазы, аспартатаминотрансферазы, кальция, хлорида, холестерина, креатинкиназы, креатина, гамма-глутамитрансферазы, глобулина, глюкозы, неорганического фосфора, калия, натрия, общего билирубина, общего белка, триглицеридов, мочевины, азота и С-реактивного белка. Доказательства токсичности в исследовании переносимости обобщены на фигурах 22-24.

В целом, животные, которым вводили немаскированные конструкции ProC286, показали в среднем 5% потери массы тела при дозе 2 мг/кг и 15% потери массы тела при дозе 10 мг/кг и 15 мг/кг (фигура 22). У одного животного, которому вводили ProC286 в дозе 15 мг/кг, через 7 дней после введения дозы (окончание исследования) наблюдали потерю массы тела на 20%. Это считается непереносимой дозой. В отличие от этого, у животных, получавших ProC440 в дозе 2 мг/кг и 10 мг/кг, не наблюдалось потери массы тела.

Животные, получавшие ProC440 в дозе 15 мг/кг, показали в среднем 5% потери массы тела (фигура 22). Это указывает на то, что АСС по настоящему изобретению с димеризованной структурой, начиная с N-конца, CP-CM-DD, неожиданно ограничивают опосредованную IFN α -2b потерю массы тела. Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что расположение N-конца интерферона DD и использование относительно короткого LR ингибирует цитокиновую активность в контексте ProC440, снижая токсичность интерферона по сравнению с пегилированным

IFN α -2b (Sylatron®) или ProC286.

С точки зрения клинической химии, у животных, которым вводили ProC286, наблюдалось значительное повышение уровня щелочной фосфатазы (ЩФ) при всех дозах (0,4 мкг, 2 мкг, 10 мкг и 15 мкг) через 7 дней после введения дозы (конец исследования) (Фигура 23). Не было измерено значительного увеличения ALP, когда животным вводили 10 или 15 мкг ProC440 (фиг. 23). Повышение АЛТ является маркером гепатотоксичности. Было показано, что IFN α -2b индуцирует гепатотоксичность. Это указывает на то, что АСС по настоящему изобретению с димеризованной структурой, начиная с N-конца, CP-CM-DD, неожиданно ограничивают опосредованную IFN α -2b гепатотоксичность.

С точки зрения гематологии, через 3 дня после введения дозы и через 7 дней после введения дозы (окончание исследования) у животных, получавших ProC286 в дозах 2 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг, наблюдалось значительное снижение количества ретикулоцитов, нейтрофилов и лейкоцитов (WBC) (фигура 24). Это снижение напоминает опосредованную IFN α -2b токсичность в отношении костного мозга. Через три дня после введения дозы у животных, которым вводили ProC440, наблюдалось снижение количества ретикулоцитов, нейтрофилов и лейкоцитов (WBC) (фигура 24). В целом уровень снижения гемопоэтических клеток, наблюдаемый у животных, которым вводили ProC440, не столь значителен, как уровни снижения, наблюдаемые у животных, которым вводили ProC286. Через 7 дней после введения дозы (конец исследования) у животных, получавших ProC440, общий уровень количества ретикулоцитов, нейтрофилов и лейкоцитов (WBC) вернулся к нормальному уровню или к уровню, аналогичному наблюдаемому у животных, которым вводили отрицательный контроль IgG4 (фигура 24). У животных, получавших ProC286, уровень количества ретикулоцитов, нейтрофилов и лейкоцитов (WBC) остается низким. Это указывает на то, что АСС по настоящему изобретению с димеризованной структурой, начиная с N-конца, CP-CM-DD, неожиданно ограничивают опосредованную IFN α -2b токсичность в отношении костного мозга.

Пример 4. *In vitro* характеристика дополнительных цитокиновых конструкций

Дополнительные активируемые цитокиновые конструкции также получали рекомбинантными методами. 1^{-я} и 2^{-я} мономерные конструкции этих АСС были идентичными. Каждая из 1^{-й} и 2^{-й} мономерных конструкций содержит, от N-конца к С-концу, сигнальную последовательность из сигнальной последовательности IgG каппа мыши (остатки 1-20 SEQ ID NO: 309), зрелый цитокиновый белок, который

соответствует интерферону альфа-2b человека (SEQ ID NO: 1), расщепляемый фрагмент (CM), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и домен димеризации, соответствующий Fc S228P IgG4 человека (содержащий SEQ ID NO: 3) . Кроме того, эти ACC содержат или не содержат линкер, имеющий аминокислотную последовательность SGGGG между CP и CM. Эти ACC содержат или не содержат линкер, имеющий аминокислотную последовательность GGGS между CM и DD. Эти ACC также содержат или не содержат части шарнира DD, которые являются N-концевыми по отношению к цистеину 226. Эти дополнительные активируемые цитокиновые конструкции описаны в таблице 6 (см. SEQ ID NO: 336-342 и SEQ ID NO: 313).

Таблица 6: Активируемые цитокины, имеющие разную длину аминокислотных последовательностей между CP и цистеином 226 IgG человека

Название	Альтернативное название	Линкер между CP и CM	Линкер между CM и DD	N-концевые остатки шарнира Fc	длина связывающей области
ProC288	IFNa2b 1204DNI 0AA Fc	SGGGG	отсутствует	отсутствует	12
ProC289	IFNa2b 1204DNI 3AA Fc	SGGGG	отсутствует	GPP	15
ProC290	IFNa2b 1204DNI 7AA Fc	SGGGG	отсутствует	ESKYGPP	19
ProC291	IFNa2b 1204DNI 11AA Fc	SGGGG	GGGS	ESKYGPP	23
ProC440	N IFNa2b 0 1204DNIIdL 0AA Fc	отсутствует	отсутствует	отсутствует	7
ProC441	N IFNa2b 0 1204DNIIdL 3AA Fc	отсутствует	отсутствует	GPP	10
ProC442	N IFNa2b 0 1204DNIIdL 7AA Fc	отсутствует	отсутствует	ESKYGPP	14
ProC443	N IFNa2b 0	отсутствует	GGGS	ESKYGPP	18

	1204DNIdL				
	11AA Fc				

Активность ProC440, АСС без гибкого линкера и Fc-области, усеченной до Cys226, и активность дополнительных АСС, содержащих различные линкеры и последовательности Fc-области, тестировали *in vitro* с использованием отвечающих на IFN клеток HEK293 и клеток Daudi, как описано ранее. В обоих анализах активность (например, антипролиферативные эффекты) ProC440 была снижена по сравнению со всеми другими АСС, содержащими различные дополнительные последовательности между цитокином и первой аминокислотой, которая связывает DD с соответствующим вторым мономером (*m.e.* Cys226). Значения EC50 для АСС рассчитывали из результатов анализа IFN α /□ и представляли ниже в таблице 7.

Таблица 7. EC50: Репортерный анализ IFN α /□

	Pro C288	Pro C289	Pro C290	Pro C291	Pro C440	Pro C441	Pro C442	Pro C443
EC50	34,34	17,93	10,33	8,743	41,37	6,28	6,637	1,687

Значения EC50 для АСС рассчитывали из результатов анализа апоптоза клеток Daudi и представляли ниже в таблице 8.

Таблица 8. EC50: Анализ апоптоза клеток Daudi

	Pro C288	Pro C289	Pro C290	Pro C291	Pro C440	Pro C441	Pro C442	Pro C443
EC50	112,8	64,55	23,04	13,39	2078	1053	642,9	478

Данные в таблицах 7-8 также показывают, что активность (нерасщепленных) АСС можно модулировать путем изменения длины аминокислотных последовательностей между цитокином и Cys226 DD.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, основываясь на результатах, представленных в данном документе, авторы настоящего изобретения предполагают, что расположение цитокина на N-конце DD и использование относительно короткого LR ингибирует цитокиновую активность в отношении цитокинов в дополнение к цитокинам интерферона-альфа, приведенным в качестве примера в приведенных выше конкретных примерах. Как описано выше, настоящее изобретение, описанное в данном документе, охватывает активируемые цитокиновые конструкции, которые содержат различные цитокиновые белки, обсуждаемые в данном документе. В качестве неограничивающих примеров СР, используемые в АСС по настоящему изобретению,

могут представлять собой любые из перечисленных в SEQ ID NO: 101-209 и их вариантами. В частности, мономерные цитокины являются подходящими для применения в АСС, описанных в данном документе. На основании результатов, представленных в данном документе, считается, что АСС по настоящему изобретению будут демонстрировать сниженную цитокиновую активность по сравнению с соответствующим цитокином дикого типа, и что при расщеплении АСС соответствующей протеазой (протеазами) продукт расщепления будет восстанавливать цитокиновую активность, аналогичную активности соответствующего цитокина дикого типа.

Иллюстративные последовательности

SEQ ID NO.	НАЗВАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	Интерферон-альфа-2b человека	CDLPQTHSLGSRRTLMMLLAQMRRISLFCLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLDDKFYTELYQQLENDLEACVIQGVGVTTETPL MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEI MRSFSLSTNLQESLRSKE
2	Линкер	GGGS
3	Fc-область IgG4 человека с мутацией S228P, усеченная до Cys226	CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLS LS
4	Fc-область IgG4 человека с мутацией S228P и полноразмерной шарнирной областью	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNH YTQKSLSLS
5	CM	LSGRSDNH
6	CM	TGRGPSWV

7	CM	PLTGRSGG
8	CM	TARGPSFK
9	CM	NTLSGRSENHSG
10	CM	NTLSGRSGNHGS
11	CM	TSTSGRSANPRG
12	CM	TSGRSANP
13	CM	VHMPLGFLGP
14	CM	AVGLLAPP
15	CM	AQNLLGMV
16	CM	QNQALRMA
17	CM	LAAPLGLL
18	CM	STFPFGMF
19	CM	ISSGLLSS
20	CM	PAGLWLDP
21	CM	VAGRSMRP
22	CM	VVPEGRRS
23	CM	ILPRSPAF
24	CM	MVLGRSLL
25	CM	QGRAITFI
26	CM	SPRSIMLA
27	CM	SMLRSMPL
28	CM	ISSGLLSGRSDNH
29	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNH
30	CM	ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH
31	CM	LSGRSGNH
32	CM	SGRSANPRG
33	CM	LSGRSDDH
34	CM	LSGRSDIH
35	CM	LSGRSDQH
36	CM	LSGRSDTH
37	CM	LSGRSDYH
38	CM	LSGRSDNP
39	CM	LSGRSANP

40	CM	LSGRSANI
41	CM	LSGRSDNI
42	CM	MIAPVAYR
43	CM	RPSPMWAY
44	CM	WATPRPMR
45	CM	FRLLDWQW
46	CM	ISSGL
47	CM	ISSGLLS
48	CM	ISSGLL
49	CM	ISSGLLSGRSANPRG
50	CM	AVGLLAPPTSGRSANPRG
51	CM	AVGLLAPPSGRSANPRG
52	CM	ISSGLLSGRSDDH
53	CM	ISSGLLSGRSDIH
54	CM	ISSGLLSGRSDQH
55	CM	ISSGLLSGRSDTH
56	CM	ISSGLLSGRSDYH
57	CM	ISSGLLSGRSDNP
58	CM	ISSGLLSGRSANP
59	CM	ISSGLLSGRSANI
60	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
61	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
62	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
63	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
64	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
65	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNP
66	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANP
67	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANI
68	CM	ISSGLLSGRSDNI
69	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
70	CM	GLSGRSDNHGGAVGLLAPP
71	CM	GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP
72	CM	LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP

73	CM	ISSGLSS
74	CM	PVGYTSSL
75	CM	DWLYWPGI
76	CM	LKAAPRWA
77	CM	GPSHLVLT
78	CM	LPGGLSPW
79	CM	MGLFSEAG
80	CM	SPLPLRVP
81	CM	RMHLRSLG
82	CM	LLAPSHRA
83	CM	GPRSFGL
84	CM	GPRSFG
85	CM	SARGPSRW
86	CM	GGWHTGRN
87	CM	HTGRSGAL
88	CM	AARGPAIH
89	CM	RGPAFNPM
90	CM	SSRGPAYL
91	CM	RGPATPIM
92	CM	RGPA
93	CM	GGQPSGMWGW
94	CM	FPRPLGITGL
95	CM	SPLTGRSG
96	CM	SAGFSLPA
97	CM	LAPLGLQRR
98	CM	SGGPLGVR
99	CM	PLGL
100	CM	SGRSDNI
101	Интерферон альфа-2а человека	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLLDKFYTELYQQLNDEACVIQGVGVTTETPL MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEI MRSFSLSTNLQESLRSKE

102	Интерферон альфа-2 крысы	CDLPHTHNLNRKRAFTLLAQMRRLSPVSCLKDRKDF GFPLEKVDGQQIQKAQAIPVLHELTQQILSLFTSKESS TAWDASLLDSFCNDLQQQLSGLQACLMQQVGVQES PLTQEDSLLAVREYFHRITVYLREKKHSPCAWEVV AEVWRALSSSANLLGRLREERNES
103	Интерферон альфа-2 мыши	CDLPHTYNLNRKRALKVLAQMRRLPFLSCLKDRQD FGFPLEKVDNQQIQKAQAIPVLRDLTQQTLNLFTSKA SSAAWNATLLDSFCN DLHQQLNDLQ TCLMQQVGVSQ EPPLTQEDAL LAVRKYFHRITVYLREKKHS PCAWEVVRAE VWRALSSSVN LLPRLSEEKE
104	Интерферон альфа- 2b человека	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLLDKFYTELYQQQLNDLEACVIQGVGVGTETPL MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEI MRSFSLSTNLQESLRSKE
105	Интерферон альфа- n3 человека	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLLDKFYTELYQQQLNDLEACVIQGVGVGTETPL MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEI MRSFSLSTNLQESLRSKECDLPQTHSLGSRRTLMLLA QMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVL HEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQQLN DLEACVIQGVGVGTETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYL KEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEC DLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRRDFGF PQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFYTELYQQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLM NEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIM RSFSLSTNLQESLRSKE
106	Интерферон бета-1a человека	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDR MNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQD SSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKE DFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTI

		VRVEILRNIFYFINRLTGYLRN
107	Интерферон бета-1b человека	SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRM NFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDS SSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKED FTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIV RVEILRNIFYFINRLTGYLRN
108	Интерферон-бета мышь	MNNRWILHAAFLLCFSTTALSINYKQLQLQERTNIRK CQELLEQLNGKINLTyrADFKIPMEMTEKMQKSYTA FAIQEMLQNVFLVFRNNFSSTGWNETIVVRLLDLH QQTVFLKTVLEEKQEERLTWEMSSTALHLKSYWWR VQRYLKLMKYNSYAWMVVRAEIFRNFLIRRLTRNF QN
109	Интерферон-бета крысы	MANRWTLHIAFLLCFSTTALSIDYKQLQFRQSTSIRT CQKLLRQLNGRLNLSYRTDFKIPMEVMHPSQMEKSY TAFAIQVMLQNVFLVFRSNFSSTGWNETIVESLLDEL HQQTELLEIILKEKQEERLTWVTSTTTLGLKSYWWR VQRYLKDKKYNYSYAWMVVRAEVFRNFSIILRLNRN FQN
110	Интерферон омега человека	MCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRISPFLCLKDRRD FRFPQEMVKGSQQLQKAHVMSVLHEMLQQIFSLFHTE RSSAAWNMTLLDQLHTGLHQQLQHLETCLLQVVGE GESAGAISSPALTLRRYFQGIRVYLKEKKYSDCAWE VVRMEIMKSLFLSTNMQERLRSKDRDLGSS
111	IL-1 альфа человека	MAKVPDMFEDLKNCYSENEEDSSSIDHLSLNQKSFY HVSYGPLHEGCMQSVSLSETSKTSKLTfKESMVV VATNGKVLKKRRLSLSQSITDDDLEAIANDSEEEIIP RSAPFSFLSNVKYNFMRIIKYEFILNDALNQSIIRAND QYLTAALHNLDEAVKFDMGAYKSSKDDAKITVIL RISKTQLYVTAQDEDQPVLLKEMPEIPKTITGSETNLL FFWETHGTKNYFTSV AHPNLFIA TKQDYWVCLAGG PPSITDFQILENQA
112	IL-1 альфа мышь	MAKVPDLFEDLKNCYSENEYSSAIDHLSLNQKSFY DASYGSLHETCTDQFVSLRTSETSKMSNFTFKESRVT VSATSSNGKILKKRRLSFSETFTEDDLQSITHDLEETI

		QPRSAPYTYQSDLRKLMKLVQRKFVMNDSLNTI YQDVDPKHLYSTTWLNDLQQEVKFDMYAYSSGGDD SKYPVTLKISDSQLFVSAQGEDQPVLLKELPETPKLIT GSETDLIFFWKSINSKNYFTSAAYPELFIATKEQSRVH LARGLPSTDFQIS
113	IL-1 бета человека	MAEVPELASEMMAYYSNGEDDLFFEADGPKQMKCS FQDL DLCPLDGGIQLRISDHHYSKGFRQAASVVVAM DKLRKMLVPCPQTFQENDLSTFFPFIFEEPIFFDTWD NEAYVHDAPVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKA LHLQGQDMEQQVVFMSFVQGEESNDKIPVALGLK EKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKR FVFNKIEINNKLFEFESAQFPNWIYSTSQAENMPVFLG GTKGGQDITDFTMQFVSS
114	IL-1 бета мыши	MATVPELNCMPFFDSDENDLFFEVDGPQKMKGCF QTFDLGCPDESIQLQISQQHINKSFRQAVSLIVAVEKL WQLPVSPWTFQDEDMSTFFSFIFEEPIPCDSWDDD DNLLVCDVPIRQLHYRLRDEQQKSLVSDPYELKAL HLNGQNINQQVIFMSFVQGEPSNDKIPVALGLKGK NLYLSCVMKDGTPTLQLESVDPKQYPKKKMEKRFV FNKIEVKSKVEFESAEPNWIYSTSQAEPKPVFLGNN SGQDIIDFTMESVSS
115	IL-1RA человека	MEICRGLRSHLITLLLFLFHSETICRPSGRKSSKMQAF RIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKIDV VPIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNI TDLSENKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLC TAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE
116	IL-1RA мыши	MEICWGPYSHLISLLLILFHSEAACRPSGKRPCCKMQ AFRIWDTNQKTFYLRNNQLIAGYLQGPNIKLEEKID MVPIDLHSVFLGIHGGKLCLSCAKSGDDIKLQLEEVN ITDLSKNKEEDKRFTFIRSEKGPTTSFESAACPGWFLC TTLEADRPVSLTNTPEEPLIVTKFYFQEDQ
117	IL-18 человека	MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLESD YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSD CRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLS

		CENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKM QFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIM FTVQNED
118	IL-18 мышцы	MAAMSEDSCVNFKEMMFIDNTLYFIPEENGDLSDN FGRLHCTTAVIRNINDQVLFVDKRQPVFEDMTDIDQS ASEPQTRLIIYMYKDSEVRGLAVTL SVKDSKMSTLSC KNKIISFEEMDPPENIDDIQSDLIFFQKRVPGHNKMEF ESSLYEGHFLACQKEDDAFKLILKKKDENGDKSVMF TLTNLHQS
119	IL-2 человека	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHL LLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI IS
120	IL-2 мышцы	MYSMQLASCVTTLTVLLVNSAPTSSSTSSSTAEAAQQ QQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLKP RMLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLT QSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDD ESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ
121	IL-4 человека	MGLTSQLLPPLFFLLACAGNFVHGHKCDITLQEIIKTL NSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFCRAATV LRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLD RNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREK YSKCSS
122	IL-4 мышцы	MGLNPQLVVILLFFLECTRSHIHGCDKNHLREIIGILN EVTGEGTPCTEMDVPNVLTATKNTTESELVCRASKV LRIFYLKHGKTPCLKKNSSVLMELQRLFRAFRCLDSS ISCTMNESKSTSLKDFLESLSIMQMDYS
123	IL-7 человека	MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDQY ESVLMVSIQQLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDA NKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSE GTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLK EQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKHEH
124	IL-7 мышцы	MFHVSFRYIFGIPPLILVLLPVTSSSECHIKDKEGKAYE

		SVLMISIDELDKMTGTDSNCPNNEPNFFRKHVCDT KEAAFLNRAARKLKQFLKMNISEEFNVHLLTVSQGT QTLVNCTSKEEKNVKEQKKNDACFLKRLREIKTCW NKILKGS
125	IL-9 человека	MLLAMVLTSAALLCSVAGQGCPTLAGILDINFLINK MQEDPASKCHCSANVTSCCLGIPSDNCTRPCFSERL SQMTNTTMQTRYPLIFSRVKKSVEVLKNNKCPYFSC EQPCNQTTAGNALTFLKSLLEIFQKEKMRGMRGKI
126	IL-9 мыши	MLVTYILASVLLFSSVLGQRCSTTWGIRDNYLIENL KDDPPSKCSCSGNVTSCCLSVPTDDCTTPCYREGLL QLTNATQKSRLLPVFHRVKRIVEVLKNITCPSFSCEK PCNQTMAGNTLSFLKSLLGTFQKTEMQRQKSRP
127	IL-13 человека	MHPLLNPLLLALGLMALLTTVIALTCLGGFASPGPV PPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTA GMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSA GQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLFREGRFN
128	IL-13 мыши	MALWVTAVLALACLGLAAPGPVPRSVSLPLTLKEL IEELSNIQDQTPLCNGSMVWSVDLAAGGFCVALDS LTNISNCNAIYRTQRILHGLCNRKAPT TVSSLPDTKIE VAHFITKLLSYTKQLFRHGPF
129	IL-15 человека	MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTE SDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTEN LILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSF VHIVQMFINTS
130	IL-15 мыши	MKILKP YMRNTSISCYLCFLNLSHFLTEAGIHVFILGC VSVGLPKTEANWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYTD SDFHPSCCKVTAMNCFLELQVILHEYSNMTLNETVR NVLYLANSTLSSKNVAESGCKECEEELEKTFTEFLQ SFIRIVQMFINTS
131	IL-3 человека	MSRLPVLLLLQLLVRPGLQAPMTQTTPKTSWVNCS NMIDEIITHLKQPPLPLDFFNNLNGEDQDILMENNLR RPNLEAFNRVAVKSLQNASAIESILKNLLPCLPLATAA PTRHPIHIKDGDWNEFRKLT FYLKTLENAQAQQT

		LSLAIF
132	IL-3 мышцы	MVLASSTTSIHMLLLLLMLFHLGLQASISGRDTHRL TRTLNCSSIVKEIIGKLPEPELKTDDGEP SLRNKSFRR VNLSKFVESQGEVDPEDRYVIKSNLQKLNCLPTSA NDSALPGVFIRDLD DFRKKLRFYMVHLNDLETVLTS RPPQPASGSVSPNRGTVEC
133	IL-5 человека	MRMLLHLSLLALGAAYVYAIPTEIPT SALVKETLALL STHRTLLIANETLRIPVPVHKNHQLCTEEIFQGIGTLE SQT VQGGTVERLFKNLSLIK KYIDGQKKKCGEERRR VNQFLDY LQEFLGVMNTEWIIES
134	IL-5 мышцы	MRRMLLHLSVLT LSCVWATAMEIPMSTVVKETLTQ LSAHRALLTSNETMRLPVPTHKNHQLCIGEIFQGLDI LKNQTVRGGTVEMLFQNL SLIK KYIDRQKEKCGEER RRTRQFLDY LQEFLGVMSTEWAMEG
135	GM-CSF человека	MWLQSLLLL GTVAC SISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQ EARLLNLSRD TAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQ TRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTP ETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE
136	GM-CSF мышцы	MWLQNLLFLGIVVYSL SAPTRSPITVTRPWKHVEAIK EALNLLDDMPVTLN EEEVVSNEFSFKKLTCVQTRL KIFEQGLRG NFTKLKGALNMTASY YQTYCPPTPETD CETQVT TYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPGQK
137	IL-6 человека	MNSFSTSAFGPVAFSLG LLLVLPAAFPAPVPPGEDSK DVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKS NMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGC FQSGFNEET CLVKIITGLLEFEVYLEYLQNR FESSEEQARAVQMST KVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQN QWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM
138	IL-6 мышцы	MKFLSARDFHPVAFLGLMLVTTTAFPTSQVRRGDFT EDTTPNRPVYTTSQVGG LITHVLWEIVEMRKELCNG NSDCMNND DALAENNLKLPEIQRNDGCYQTGYNQE ICLLKISSGLLEYHSYLEYMKNNLKDNKKDKARVLQ RDTETLIHIFNQEVKDLHKIVLPTPISNALLTDKLESQ KEWLRTKTIQFILKSLEEFLKVTLRSTRQT

139	IL-11 человека	MNCVCRLVLVVLSPWPDVAVAPGPPPGPPRVSPDPR AELDSTVLLTRSLADTRQLAAQLRDKFPADGDHNL DSLPTLAMSAGALGALQLPGVLTRLRADLLSYLRHV QWLRRAAGGSSSLKTLEPELGTQLARLDRLRLRLQLLM SRLALPQPPDPAPPLAPPSSAWGGIRAAHAILGGL HLTLDWAVRGLLLKTRL
140	IL-11 мыши	MNCVCRLVLVVLSPWPDVVAPGPPAGSPRVSSDPR ADLDSAVLLTRSLADTRQLAAQMRDKFPADGDHS LDSLPTLAMSAGTLGSLQLPGVLTRLRVDLMSYLRH VQWLRRAAGGPSLKTLEPELGALQARLERLLRLQLL MSRLALPQAAPDQPVIPLGPPASAWGSIRAAHAILGG LHLTLDWAVRGLLLKTRL
141	G-CSF человека	MAGPATQSPMKLMALQLLWHSALWTVQEATPLGP ASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVSSECAT YKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCL SQLHSGFLFYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVAD FATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRR AGGVLVASHLQSFLEVSRYRVLRLHLAQP
142	G-CSF мыши	MAQLSAQRRMKLMALQLLWQSALWSGREAVPLV TVSALPPSLPLPRSFLKSLQVRKIQASGSVLEQLC ATYKLCHPEELVLLGHSLGIPKASLSGCSSQALQQTQ CLSQLHSGLCCLYQGLLQALSGISPALPTDLLQLDV ANFATTIWQQMENLGVAPTQVQPTQSAMPAFTSAFQR RAGGVLAISYLGFFLETARLALHHLA
143	IL-12 альфа человека	MCPARSLLLVA TLVLLDHLSLARNLPVATPDPMFP CLHHSQNLLRAVSNNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHE DITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSC LASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKS SLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
144	IL-12 бета человека	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELD WYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKKE DGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTCW

		WLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV RGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVH KLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEV SWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVF TDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVP CS
145	IL-12 бета мыши	MCPQKLTIWFIAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEV DWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGS GKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKK ENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWL QRNMDLKFNKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTL DQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQ NKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVS WEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGC NQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSC SKWACVPCRVS
146	IL-12 альфа мыши	MCQSRYLLFLATLALLNHLSTARVIPVSGPARCLSQS RNLLKTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRD QTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPQ KTSMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNH HQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGE ADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSA
147	LIF человека	MKVLAAGVPLLLVLHWKHGAGSPLPITPVNATCAI RHPCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGE PFPNNLDKLCGPNVTDFPPFHANGTEKAKLVELYRIV VYLGTSLGNITRDQKILNPSALSLHSLNATADILRG LLSNVLCRLCSKYHVGHVDVTYGPDTSGKDVQKK KLGQCQLLGKYKQIIAVLAQAF
148	LIF мыши	MKVLAAGIVPLLLLVLHWKHGAGSPLPITPVNATCA IRHPCHGNLMNQIKNQLAQLNGSANALFISYYTAQG EPFPNNVEKLCAPNMTDFPSFHGNGTEKTKLVELYR MVAYLSASLTNITRDQKVLNPTAVSLQVKLNATIDV MRGLLSNVLCRLCNKYRVGHVDVPPVPDHSDEAF QRKKLGQCQLLGTYKQVISVVVQAF

149	OSM человека	MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAAIGSCSKEYR VLLGQLQKQTDLMQDTSRLDPYIRIQGLDVPKLRE HCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGCVLH RLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNIL GLRNNIYCMAQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTP ASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHSVGRVFSKWGES PNRSRRHSPHQALRKGVRRTRPSRK GKRLMTRGQLP R
150	OSM мышцы	MQTRLLRTLLSLTSLLLISMA LANRGCSNSSSQLLS QLQNQANLTGNTESLLEPYIRLQNLNTPDLRAACTQ HSVAFPSEDTLRQLSKPHFLSTVYTTLDRVLYQLDAL RQKFLKTPAFPKLDSARHNILGIRNNVFCMARLLNHS LEIPEPTQTD SGASRSTTTPDVFN TKIGSCGFLWGYH RFMGSVGRVFREWDDGSTRSRRQSPLRARRKGTRRI RVRHKGTRRIRVRRKGTRRIWVRRKGSRKIRPSRSTQ SPTTRA
151	IL-10 человека	MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGN LPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLE DFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKN AFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
152	IL-10 мышцы	MPGSALLCCLLLLTGMRISRGQYSREDNNCTHFVPG QSHMLLELRTAFSQVK TFFQTKDQLDNILLTDSL MQ DFKGYLGCQALSEMIQFYLV EVMPPQAEKHGPEIKEH LNSLGEK LKTLRMRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKS DFNKLQDQGVYKAMNEFDIFINCIEAYMMIKMKS
153	IL-20 человека	MKASSLAFSLLSAAFYLLWTPSTGLKTLNLGSCVIAT NLQEIRNGFSEIRGSVQAKDGNIDIRILRRTESLQDTK PANRCCLLRHLLRLYLDRVFKNYQTPDHYTLRKISSL ANSFLT IKKDLRLCHAHMTCHCGEEAMKKYSQILSH FEKLEPQA AVVKALGELDILLQWMEETE
154	IL-20 мышцы	MKGFGLAFLFS AVGFLLWTPLTGLKTLHLGSCVIT ANLQAIQKEFSEIRDSVQAEDTNIDIRILRTTESLKD IK SLDRCCFLRHLVRFYLD R VFKVYQTPDHHTLRKISSL

		ANSFLIIKKDLSVCHSHMACHCGEEAMEKYNQILSH FIELELQAAVVKALGELGILLRWMEEML
155	IL-14 человека	MKNQDKKNGAAKQSNPKSSPGQPEAGPEGAQERPS QAAPAVEAEGPGSSQAPRKPEGAQARTAQSGALRD VSEELSRQLEDILSTYCVDDNNQGGPGEDGAQGEPAE PEDAEKSRTYVARNGEPEPTPVVNGEKEPSKGDPT EEIRQSDEVGDRDHRRPQEKKKAKGLGKEITLLMQT LNTLSTPEEKLAALCKKYAELLEHRNSQKQMKLLQ KKQSQLVQEKDHLRGEHSKAVLARSKLESLCRELQR HNRSLKEEGVQRAREEEEEKRKEVTSHFQVTLNDIQL QMEQHNERNSKLRQENMELAERLKKLIEQYELREEH IDKVFKHKDLQQQLVDAKLQQAQEMLKEAEERHQR EKDFLLKEAVESQRMCELMKQQETHLKQQLALYTE KFEEFQNTLSKSSEVFTTFKQEMEKMTKKIKKLEKET TMYRSRWESSNKALLEMAEEKTVRDKELEGLQVKI QRLEKLCRALQTERNDLNKRVQDLSAGGQGS LTDS GPERRPEGPGAQAPSSPRVTEAPCYPGAPSTEASGQT GPQEPTSARA
156	IL-14 мыши	MKNQDKKNGPAKHSNSKSGSPGQREAGPEGAHGRPR QTAPGAEAEGSTSQAPGKTEGARAKAAQPGALCDV SEELSRQLEDILSTYCVDDNNQGGPAEEGAQGEPTEPE DTEKSRTYAARNGEPEPGIPVVNGEKETSKGEPGTEE IRASDEVGDRDHRRPQEKKKAKGLGKEITLLMQTLN TLSTPEEKLAALCKKYAELLEHRNSQKQMKLLQKK QSQLVQEKDHLRGEHSKAVLARSKLESLCRELQRHN RSLKEEGVQRAREEEEEKRKEVTSHFQVTLNDIQLQM EQHNERNSKLRQENMELAERLKKLIEQYELREEHID KVFKHKDLQQQLVDAKLQQAQEMLKEAEERHQRE KEFLLKEAVESQRMCELMKQQETHLKQQLALYTEK FEEFQNTLSKSSEVFTTFKQEMEKMTKKIKKLEKET MYRSRWESSNKALLEMAEEKTVRDKELEGLQVKIQ RLEKLCRALQTERNDLNKRVQDLTAGGITDIGSERRP EATTASKEQGVESPGAQPASSPRATDAPCCSGAPSTG TAGQTGPGEPTPATA

157	IL-16 человека	MESH SRAGKSRKSAKFRSISRSLMLCNAKTSDDGSSP DEKY PDPFEISLAQGKEGIFHSSVQLADTSEAGPSSVP DLALASEAAQLQAAGNDRGKTCRRIFFMKESSTASS REKPGKLEAQSSNFLFPKACHQRARSNSTSVNPYCT REIDFPMTKKSAAPTDRQPYSLCSNRKSLSQQLDCPA GKAAGTSRPTSLSTAQLVQPSGGLQASVISNIVLMK GQAKGLGFSIVGGKDSIYGPIGIYVKTI FAGGAAAAD GRLQEGDEILELNGESMAGLTHQDALQKFKQAKKG LLTLTVRTRLTAPPSLCSHLSPPLCRSLSSSTCITKDSS SFALESPSAPISTAKPNYRIMVEVSLQKEAGVGLGIGL CSVYFQCISGIFVHTLSPGSVAHL DGR LRCGDEIVEI SDSPVHCLTLNEVY TILSHCDPGVPVIIVSRHPDPQVS EQLKEAVAQAVENTKFGKERHQWSLEGV KRLESS WHGRPTLEKEREKNSAPPHRAQKVMIRSSSDSSYM SGSPGGSPGSGSAEKPSSD VDISTHSPSLPLAREPVVL SIASSRLPQESPLPESRDSHPPLRLKKSFEIVRKPMSS KPKPPPRKYFKSDSDPQKSLEERENSSCSSGHTPPTC GQEARELLPLLLPQEDTAGRSPSASAGCPGP GIGPQT KSSTEGEPGWRRASPVTQTSP I KHP LLKRQARMDYS FDTTAEDPWVRISDCIKNLFSPIMSENHGHMPLQPNA SLNEEEGTQGH PDGTPPKLDTANGTPKVYKSADSST VKKGPPVAPKPAWFRQSLKGLRNRASDP RGLPD PAL STQPAPASREHLGSHIRASSSSSSIRQRISSFETFGSSQL PDKGAQRLSLQPSSGEAAKPLGKHEEGRFSGLLGRG AAPTLPVQQPEQVLSSGSPAASEARDPGVSESPPPGR QPNQKTLPPGPDPLRLLLSTQAEESQGPVLKMPSQRA RSFPLTRSQCETKLLDEKTSKLYSISSQVSSAVMKSL LCLPSSISCAQTPCIPKEGASPTSSSNEDSAANGSAETS ALDTGFSNLSELREYTEGLTEAKEDDDGDHSSLQS GQSVISLLSSEELKKLIEEVKVLDEATLKQLDGIHVTI LHKEEGAGLGFSLAGGADLENKVITVHRVFPNGLAS QEGTIQKGNEVLSINGKSLKGTTHHDALAILRQAREP RQAVIVTRKLTPEAMPDLNSSTD SAASASAASDVSV ESTAEATVCTVTLEKMSAGLGFSLEGGKGS LHGDKP
-----	----------------	--

		LTINRIFKGAASEQSETVQPGDEILQLGGTAMQGLTR FEAWNIIKALPDGPVTIVIRRKSLQSKETTAAGDS
158	IL-16 мыши	MEPHGHSGKSRKSTKFRSISRSLILCNAKTSDDGSSP DEKYPDPFETSLCQGKEGFFHSSMQLADTFEAGLSNI PDLALASDSAQLAAAGSDRGKHCRKMFFMKESSSTS SKEKSGKPEAQSSSFLFPKACHQRTRSNSTSVNPYSA GEIDFPMTKKSAAPTDRQPYSLCSNRKSLSQQLDYPI LGTARPTRSLSTAQLGQLSGGLQASVISNIVLMKGQA KGLGFSIVGGKDSIYGPIGIYVKSIFAGGAAAADGRL QEGDEILELNGESMAGLTHQDALQKFKQAKKGLLTL TVRTRLTTPPSLCSHLSPPLCRSLSSSTCGAQDSSPFSL ESPASPASTAKPNYRIMVEVSLKKEAGVGLGIGLCSI PYFQCISGIFVHTLSPGSVAHLDGRLRCGDEIVEINDS PVHCLTLNEVYTILSHCDPGPVPIIVSRHPDPQVSEQQ LKEAVAQAVEGVKFGKDRHQWSLEGVKRLESSWH GRPTLEKEREKHSAPPHRAQKIMVRSSSDSSYMSG PGGSPCSAGAEPQPSEREGSTHSPSLSPGEEQEPCPGV PSRPQQESPLPESLERESHPLRLKKSFEILVRKPTSS KPKPPPRKYFKNDSEPQKKLEEKEKVTDP SGHTLPTC SQETRELLPLLLQEDTAGRAPCTAACCPGPAASTQTS SSTEGESRRSASPETPASPGKHPLLRQARMDYSFDI TAEDPWVRISDCIKNLFSPIMSENHSHTPLQPNTSLGE EDGTQGCPEGGLSKMDAANGAPRVYKSADGSTVKK GPPVAPKPAWFRQSLKGLRNRAPDPRRPPEVASAIQP TPVSRDPPGPQPQASSIRQRISSENFSGSSQLPDRGV QRLSLQPSSGETTKFPGKQDGGFRSGLLGQGATVTA KHRQTEVESMSTTFPNSSEVRDPGLPESPPPGQRPST KALSPDPLRLRLTTQSED TQGPGLKMPSQRARSFPLT RTQSCETKLLDEKASKLYSISSQLSSAVMKSLCLPSS VSCGQITCIPKERVSPKSPCNNSSAAEGFGEAMASDT GFSNLNSELREYSEGLTEPGETEDRNHCSSQAGQSVI SLLSAEELEKLIIEVRVLDEATLKQLDSIHVTILHKEE GAGLGFSLAGGADLENKVITVHRVFPNGLASQEGTI QKGNEVLSINGKSLKGATHNDALAILRQARDPRQAV

		IVTRRTTVEATHDLNSSTDASAASASASDISVESKEA TVCTVTLEKTSAGLGFSLEGGKGS LHGDKPLTINRIF KGTEQGEMVQPGDEILQLAGTAVQGLTRFEAWNVI KALPDGPVTIVIRRTSLQCKQTTASADS
159	IL-17 человека	MTPGKTSLSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNP GCPNSED KNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDY YNRSTSPW NLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYH MNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCV TPIVHHVA
160	IL-17 мыши	MSPGRASSVSLMLLLLLSLAATVKAAAIPQSSACPN TEAKDFLQNVKVN LKVFNSLGAKVSSRRPSDYL NRS TSPWTLHRNEDPDRYPSVIWEAQCRHQRCVNAEGK LDHHMNSVLIQQEILVLKREPESCPFTFRVEKMLVGV GCTCVASIVRQAA
161	CD154 человека	MIETYNQTSRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIG SALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSF EMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYT MSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFC SNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ QSIHLGGVFELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFG LLKL
162	CD154 мыши	MIETYSQSPRSVATGLPASMKIFMYLLTVFLITQMIG SVLFAVYLHRRLDKVEEEVNLHEDFVFIKKLKRCNK GEGSLSLNCEEMRRQFEDLVKDITLNKEEKKENSFE MQRGDEDQPQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGY Y TMKSNLVMLENGKQLTVKREGLYYVYTQVTFC SNR EPSSQRPFIVGLWLKPSSGSERILLKAANTHSSSQLCE QQSVHLGGVFELQAGASVFNVT EASQVIHRVGFSS FGLLKL
163	LT-бета человека	MGALGLEGRGGRLQGRGSLLLAVAGATSLVTLLLA VPITVLAVLALVPQDQGGLVTETADPGAQAQQGLGF QKLPEEEPETDLSPGLPAAHLIGAPLKGQGLGWETTK EQAFLTSGTQFSDAEG LALPQDGLYYLYCLVGYRGR

		APPGGGDPQGRSVTLRSSLYRAGGAYGPGTPELLLE GAETVTPVLDPARRQGYGPLWYTSVGFGGLVQLRR GERVYVNISHPDMVDFARGKTFFGAVMVG
164	LT-бета мышцы	MGTRGLQQLGGRPQGRGCLLLAVAGATSLVTLLLA VPITVLAVLALVPQDQGRRVEKIIGSGAQAQKRLDD SKPSCILPSPSSLSETPDRLHPQRSNASRNLASTSQGP VAQSSREASAWMTILSPAADSTPDPGVQQLPKGEPE TDLNPELPAAHLIGAWMSGQGLSWEASQEEAFLRSG AQFSPTHGLALPQDGVYYLYCHVGYRGRTPPAGRSR ARSLTLRSALYRAGGAYGRGSPELLLEGAETVTPVV DPIGYGSLWYTSVGFGGLAQLRSGERVYVNISHPDM VDYRRGKTFFGAVMVG
165	TNF-альфа человека	STESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFL IVAGATTFLCLLHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQAV RSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANAL LANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGKGQGPCST HVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAE AKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAES GQVYFGIIAL
166	TNF-альфа мышцы	NHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNQLVVP DGLYLVYSQVLFGKGQGPCDYVLLTHTVSRFAISYQE KVNLLSAVKSPCKDTPEGAELKPWYEPIYLGGVFQ LEKGDQLSAEVNLPKYLDFAESGQVYFGVIAL
167	TNF-бета человека	MTPPERLFLPRVCGTTLHLLLGLLLVLLPGAQGLPG VGLTPSAAQTARQHPKMHLAHSTLKPAAHLIGDPSK QNSLLWRANTDRAFLQDGFSLSNNSLLVPTSGIYFV YSQVVFSGKAYSPKATSSPLYLAHEVQLFSSQYPFHV PLLSSQKMVYPGLQEPWLHSMYHGAAFQLTQGDQL STHTDGIPHLVLSPTVFFGAFAL
168	4-1BBL человека	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGL LLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLR EGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYY VFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA

		LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSE
169	4-1BBL мыши	MDQHTLDVEDTADARHPAGTSCPSDAALLRDTGLL ADAALLSDTVRPTNAALPTDAAYPAVNVRDREAAW PPALNFCSRHPKLYGLVALVLLLLIAACVPIFTRTEPR PALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQQGS PVFAKLLAKNQASLCNTTLNWHSQDGAGSSYLSQG LRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPFTNTGHK VQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFPCSMENK LVDRSWSQLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRD WELSYPNNTTSFGLFLVKPDNPWE
170	APRIL человека	AVLTQKQKKQHSVLHLPINATSKDDSDVTEVMWQ PALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDV TFTMGQVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHPDRAYNS CYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHGTFLGF VKL
171	APRIL мыши	MPASSPGHMGGSVREPALSVALWLSWGA VLGA VTC AVALLIQQTELQSLRREVSRLQRSGGPSQKQGERPW QSLWEQSPDVLEAWKDGA KSRRRR AVLTKHKKK HSVLHLPVNITSKADSDVTEVMWQPVLRRGRGLE AQGDIVRVWDTGIYLLYSQVLFHDVTFTMGQVVSR EGQGRRETLFR CIRSMPSDPDRAYNSCYSAGVFHLH QGDITVKIPRANA KLNLSPHGTFLGFVKL
172	CD70 человека	MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVV CIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPR LYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHI QVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRSLF HQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDET FFGVQWVRP
173	CD70 мыши	MPEEGRPCPWVRWSGTA FQRQWPWLLL VVFITVFC CWFHCSGLLSKQQQRLLEHPEPHTAELQLNLTVPRK DPTLRWGAGPALGRSFTHGPELEEGHLRIHQDGLYR LHIQVTLANCSSPGSTLQHRATLAVGICSPA AHGISLL

		RGRFGQDCTVALQRLTYLVHGDVLCNTLTLPLPSR NADETFFGVQWICP
174	CD153 человека	MDPGLQQALNGMAPPGDTAMHVPAGSVASHLGTT RSYFYLTATLALCLVFTVATIMVLVVQRTDSIPNSP DNVPLKGGNCSEDLCLKRAPFKKSWAYLQVAKH LNKTKLSWNKDILHGVRYQDGNLVIQFPGLYFIICQ LQFLVQCPNNSVDLKELELINKHIKKQALVTVCESG MQTKHVYQNLSQFLLDYLVNTTISVNVDTFQYIDT STFPLENVLSIFLYSNSD
175	CD153 мышцы	MEPGLQQAGSCGAPSPDPAMQVQPGSVASPWSTR PWRSTSRSYFYLTALVCLVAVAILLVVQKKDS TPNTTEKAPLKGGNCSEDLFCTLKSTPSKKSWAYLQ VSKHLNNTKLSWNEDGTIHLIYQDGNLIVQFPGLY FIVCQLQFLVQCSNHSVDLTLQLLINSKIKKQTLVTV CESGVQSKNIYQNLSQFLHLYLVNSTISVRVDNFQY VDTNTFPLDNVLSVFLYSSD
176	CD178 человека	MQQPFNYYPQIYWVDSSASSPWAPP GTVLPCPTSV PRRPGQRRPPPPPPPPPLPPPPPPPLPPLPLPPLKKRG NHSTGLCLLVMMFMVLVALVGLGLGMFQLFHLQKE LAELRESTSQMHTASSLEKQIGHPSPPPEKKELRKVA HLTGKSNSRSMPLWEDTYGIVLLSGVKYKKGGLVI NETGLYFVYSKVYFRGQSCNNLPLSHKVYMRNSKY PQDLVMMEGKMMSYCTTGQMWARSSYLGA VFNLT SADHLYVNVSEL SLVNFEESQTFFGLYKL
177	CD178 мышцы	MQQPMNYPCPQIFWVDSSATSSWAPP GSVFPCPSCG PRGPDQRRPPPPPPPV SPLPPPSQPLPLPPLTPLKKKDH NTNLWLPVVFFMV LVALVGMGLGMYQLFHLQKEL AELREFTNQSLKVSSF EKQIANPSTPSEKKEPRSV AHL TGNPHSR SIPLEWEDTYGTALISGVKYKKGGLVINET GLYFVYSKVYFRGQSCNNQPLNHKVYMRNSKY PED LVLMEEKRLNYCTTGQIWAHSSYLGA VFNLT SADHL YVNISQLSLINFEESKTFFGLYKL
178	GITRL человека	MTLHPSPITCEFLFSTALISPKMCLSHLENMPLSHSRT QGAQRSSWKLWLFC SIVMLLFLCSFSWLIFLQLET

		AKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLE ILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMI QTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKN NTYWGIILLANPQFIS
179	GITRL мышцы	MEEMPLRESSPQRAERCKKSWLLCIVALLMLLCSL GTLIYTSLKPTAIESCMVKFELSSSKWHMTSPKPHCV NTTSDGKLKILQSGTYLIYGQVIPVDKKYIKDNAPFV VQIYKKNDVLQTLMNDFQILPIGGVYELHAGDNIYL KFNSKDHIQKTNTYWGIILMPDLPFIS
180	LIGHT человека	MEESVVRPSVFVVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCSVA RVGLGLLLLLMGAGLAVQGWFLQLHWR LGEMVT RLPDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AHLTGANSSLT GSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYY YIYSKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELE LLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEK VVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV
181	LIGHT мышцы	MESVVQPSVFVVDGQTDIPFRRLEQNHRRRRCGTVQ VSLALVLLGAGLATQGWFLRLHQRLGDIVAHLPD GGKGSWEKLIQDQRSHQANPA AHLTGANASLIGIGG PLLWETRLGLAFLRGLTYHDGALVTMEPGYYYVYS KVQLSGVGCPQGLANGLPITHGLYKRTSRYPKLELE LVSRSPCGRANSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEV VVRVPGNRLVRPRDGTRSYFGAFMV
182	OX40L человека	MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGLGL LLCFTYICLHFSALQVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKG FILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYSQE VNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDK VYLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
183	OX40L мышцы	MEGEGVQPLDENLENGSRPRFKWKKTLRLVVSIGIKG AGMLLCFIYVCLQLSSSPAKDPPIQRLRGAVTRCEDG QLFISSYKNEYQTMEVQNNSVVIKCDGLYIIYLKGSF FQEVKIDLHFREDHNPISIPMLNDGRRIVFTTVASLAF KDKVYLTVNAPDTLCEHLQINDGELIVVQLTPGYCA PEGSYHSTVNQVP

184	TALL-1 человека	MDDSTEREQSRLTSCCLKREEMKLKECVSILPRKESP SVRSSKD GKLLAATLLLALLSCCLTVVSFYQVAALQ GDLASLRAELQGHHA EKLPAGAGAPKAGLEEAPAV TAGLKIFEPPAPGEGNSSQNSRNKRAVQGPEETVTQD CLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAL EEKE NKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGH LIQRKKVH VFGDELSLVTLFRCIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEE GDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL
185	TALL-1 мышцы	MAMAFCPKDQYWDSSRKSCVSCALTCSQRSQRTCT DFCKFINCRKEQGRYYDHLLGACVSCDSTCTQHPQQ CAHFCEKRPRSQANLQPELGRPQAGEVEVRSDNSGR HQGSEHGPGRLRLSSDQLTLYCTLGVCLCAIFCCFLVA LASFLRRRGEPLPSQPAGPRGSQANS PHAHRPVTEAC DEVTASPQPVETCSFCFPERSSPTQESAPRSLGIHGFA GTAAPQPCMRATVGGLGVLRAS TGDARPAT
186	TRAIL человека	MAMMEVQGGPSLGQTCVLIVIFTVLLQSLCVAVTYV YFTNELKQM QDKYSKSGIACFLKEDDSYWDPNDEES MNSPCWQVKWQLRQLVRKMILRTSEETISTVQEKQ QNISPLVRERGPQRVA AHITGTRGRSNTLSSPNSKNE KALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGF YYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYP DPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKEN DRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVG
187	TRAIL мышцы	MPSSGALKDLSFSQHFRMMVICIVLLQVLLQAVSVA VTYMYFTNEMKQLQDNYSKIGLACFSKTDED FWDS TDGEILNRPC LQVKRQLYQLIEEVT LR TFQDTISTVPE KQLSTPPLPRGGRPQKVAAHITGITRRSNSALIPISKD GKTLGQKIESWESSRK GHSFLNHVLF R NGELVIEQEG LYYIYSQTYFRFQEAEDASKMVSKDKVRTKQLVQYI YKYTSYPDPIVLMKSARNSCWSRDAEYGLYSIYQGG LFELKKNDRIFVSVTNEHLM DLDQEASFFGAFLIN
188	TWEAK человека	MAARRSQRRRGRRGEPGTALLVPLALGLGLALACL GLLLAVVSLGSRASLSAQEP AQEELVAEEDQDPSEL

		NPQTEESQDPAPFLNRLVRPRRSAPKGRKTRARRAIA AHYEVHPRPGQDGAQAGVDGTVSGWEEARINSSSPL RYNRQIGEFIVTRAGLYYLYCQVHFDEGKAVYLKLD LLVDGVLALRCLEEFSAATAASSLGPQLRLCQVSGLL ALRPGSSLRIRTLPW AHLKAAPFLTYFGLFQVH
189	TWEAK мышцы	MASAWPRSLPQILVLGFGLVLMRAAAGEQAPGTSPC SSGSSWSADLDKCMDCASCPARPHSDFCLGCAAAPP AHFRLWLPILGGALSLVLVLALVSSFLVWRRRCRRRE KFTTPIEETGGEGCPGVALIQ
190	TRANCE человека	MRRASRDYTKYLRGSEEMGGGPGAPHEGPLHAPPPP APHQPPAASRSMFVALLGLGLGQVVCVALFFYFRA QMDPNRISEDGTHCIYRILRLHENADFQD TTLESQDT KLIPDSCRRIKQAFQGAVQKELQHIVGSQHIRAEKAM VDGSWLDLAKRSKLEAQPF AHLTINATDIPSGSHKVS LSSWYHDRGWAKISNMTFSNGKLIVNQDGFYYLYA NICFRHHETSGDLATEYLQLMVYVTKTSIKIPSSHTL MKGGSTKYWSGNSEHFY SINVGGFFKLRSGEEISIE VSNPSLLDPDQDATYFGAFKVRDID
191	TRANCE мышцы	MRRASRDYGYKLYRSSEEMGSGPGVPHEGPLHPAPSA PAPAPPPAASRSMFLALLGLGLGQVVC SIALFLYFRA QMDPNRISEDSTHCFYRILRLHENADLQDSTLESED LPDSCR RMKQAFQGAVQKELQHIVGPQRFSGAPAM MEGSWLDVAQRGKPEAQPF AHLTINAASIPSGSHKV TLSSWYHDRGWAKISNM T L SNGKLRVNQDGFYYLY ANICFRHHETSGSVPTDYLQLMVYVVKTSIKIPSSHN LMKGGSTKNWSGNSEHFY SINVGGFFKLRAGEEISI QVSNPSLLDPDQDATYFGAFKVQDID
192	TGF-бета 1 человека	MPPSGLRLLLLLLPLLWLLVLT PGRPAAGLSTCKTID MELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPE AVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRV LMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPV LLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSN RLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLS AHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRP

		FLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKN CCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCP YIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEP LPVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS
193	TGF-бета 1 мышцы	MPPSGLRLLPLLLPLPWLLVLT PGRPAAGLSTCKTID MELVKKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPE AVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRV LMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPL LSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGN RLLTPTDTP EWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFRFS AHCSCDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHD MNRPF LLMATPLERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTEKN C CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYI WSLDTQYSKVLALYNQHNP GASASPCCVPALEPLP IVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS
194	TGF-бета 2 человека	MHYCVLSAFLILHLVTVALSLSTCSTLDM DQFMRKR IEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRD LLQE KASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMP PFF PSENAIPPTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKA EF RVFRLQNP KARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDS KVVKTRAEGEWLSFDVTD AVHEWLHHKDRNLGFKI SLHCPCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYT SGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLMLLPSYRLESQQTN RRKKRALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGW KWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQH SRVLSLY NTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSN MIVKSCKCS
195	TGF-бета 2 мышцы	MHYCVLSTFLLLHLVPVALSLSTCSTLDM DQFMRKR IEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPDEVPEVISIYNSTR DLLQE KASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMP SH LPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFDVSTMEKNASNLVKA E FRVFRLQNP KARVAEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYI DSKVVKTRAEGEWLSFDVTD AVQEWLHHKDRNLG FKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTST

		YASGDQKTIKSTRKKTSGKTPHLLMLLPYSYRLESQQ SSRRKKRALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLG WKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHTKVLSL YNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGNTPKIEQLS NMIVKSKCS
196	TGF-бета 3 человека	MKMHLQRALVVLALLNFATVSLSLSTCTTLDFGHIK KKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALY NSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFD MIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTN LFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQ RYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNL GLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNED DHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPG QGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDL GWKWVHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLG LYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQ LSNMVVKSKCS
197	TGF-бета 3 мыши	MHLQRALVVLALLNLATISLSLSTCTTLDFGHIKKR VEAIRGQILSKLRLTSPPEPSVMTHVPYQVLALYNST RELLEEMHGEREEGCTQETSESEYYAKEIHKFDMIQ GLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNGTNLFR AEFRVLRVPNPSSKRTEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLE ISIHCPCHTFQPNGDILENVHEVMEIKFKGVDNEDDH GRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDSPGQGS QRKKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGW KWVHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLY NTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLS NMVVKSKCS
198	EPO человека	MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDS RVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKV NFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQAL LVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAQK EAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKL

		KLYTGEACRTGDR
199	ЕРО мыши	MGVPERPTLLLLLSLLLIPLGLPVLCAPPRLICDSRVL ERYILEAKEAENVMTMGCAEGPRLSENITVPDTKVN YAWKRMEVEEQAIQEVWQGLSLLSEAILQAQALLAN SSQPPETLQLHIDKAISGLRSLTSLLRVLGAQKELMSP PDTTPAPLRTLTVDTFCKLFRVYANFLRGKCLKLYTG EVCRRGDR
200	ТРО человека	MELTELLLVMMLLTARLTSSPAPPACDLRVLSKLL RDSHVLHSRLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKT QMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSL LGQLSGQVRLLLGLALQSLGTQLPPQGRTTAHKDPN AIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVP SRTSLVLTLNELPNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLK WQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLNGT RGLFPGPSRRTLGAPODISSGTSDTGSLPPNLQPGYSPS PTHPPTGQYTLFPLPPTLPTPVVQLHPLLDPSPAPTPT PTSPLLNTSYTHSQNLSQEG
201	ТРО мыши	MELTDLLLAAMLLAVARLTSSPVAPACDPRLNKL LRDSHLLHSRLSQCPOVDPLSIPVLLPAVDFSLGEWK TQTEQSKAQDILGAVSLLLEGVMAARGQLEPSCSS LLGQLSGQVRLLLGLALQGLGTQLPLQGRRTTAHKDP NALFLSLQQLLRGKVRFLLLVEGPTLCVRRTLPTTAV PSSTSQLLTLNKFNPRTSGLLETNFSVTARTAGPGLLS RLQGFRVKITPGQLNQTSRSPVQISGYLNRTGHPVNG THGLFAGTSLQTLEASDISPGAFNKGSLAFNLQGGLP PSPSLAPDGHTPFPPSPALPTTHGSPQLHPLFPDPSTT MPNSTAPHPVTMYPHPRNLSQET
202	FLT-3L человека	MTVLAPAWSPTTYLLLLLLLSSGLSGTQDCSFQHSP SSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGL WRLVLAQRWMERLKTVAGSKMQGLLERVNTIEHFV TKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWIT RQNF SRCLELQCQPDSSSTLPPPWSRPLEATAPTAPQ PLLLLLLLLPVGLLLAAAWCLHWQRTTRRRTPRPGE QVPPVPSPQDLLLLVEH

203	FLT-3L мыши	MTVLAPAWSPNSSLLLLLLLLSPCLRGTPDCYFSSHPI SSNFKVKFRELTDHLLKDYPVTVAVNLQDEKHCKA LWSLFLAQRWIEQLKTVAGSKMQTLLEDVNTEIHFV TSCTFQPLPECLRFVQTNISHLLKDTCTQLLALKPCIG KACQNFSRCLEVQCQPDSSSTLLPPRSPIALEATELPEP RPRQLLLLLLLLLLPLTLVLLAAAWGLRWQRARRRGE LHPGVPLPSHP
204	SCF человека	MKKTQTWILTCIYLQLLLFNPLVKTEGICRNRVTNN VKDVTCLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLP SHCWIS EMVVQLSDSLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVD DLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSI DAFKDFVVASETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFML PPVAASSLRNDSSSSNRKAKNPPGDSSLHWAAMALP ALFSLIIGFAFGALYWKKRQPSLTRA VENIQINEEDNE ISMLQEKEREFQEV
205	SCF мыши	MKKTQTWIITCIYLQLLLFNPLVKTKEICGNPVTDNV KDITKLVANLPNDYMITLNYVAGMDVLP SHCWLRD MVIQLSLSLTTLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLGKIVDDL VLCMEENAPKNIKESPKRPETRSFTPEEFFSIFNRSIDA FKDFMVASDTSDCVLSSTLGPEKDSRVSVTKPFMLPP VAASSLRNDSSSSNRKAAKAPEDSGLQWTAMALPA LISLVIGFAFGALYWKKKQSSLTRA VENIQINEEDNEI SMLQQKEREFQEV
206	M-CSF человека	MTAPGAAGRCPTTWLGSLLLLVCLLASRSITEEVSE YCSHMIGSGHLQSLQRLIDSQMETSCQITFEFVDQEQ LKDPVCYLKKAFLLVQDIMEDTMRFRDNTNPNAIAIV QLQELSLRLKSCFTKDYEEDHKACVRTFYETPLQLE KVKNVFNETKNLLDKDWNIFSKNCNNSFAECSSQDV VTKPDCNCLYPKAIPSSDPASVSPHQPLAPSMAPVAG LTWEDSEGTEGSSLLPGEQPLHTVDPGSAKQRPPRST CQSFEPPEPVPVKDSTIGGSPQPRPSVGAFNPGMEDIL DSAMGTNWVPEEASGEASEIPVPQGTELSRPGGGS MQTEPARPSNFLSASSPLPASAKGQQPADVTGTALPR VGPVRPTGQDWNHTPQKTDHPSALLRDPPEPGSPRIS

		SLRPQGLSNPSTLSAQPQLSRSHSSGSVLPLGELEGRR STRDRRSPAEEGGPASEGAARPLPRFNSVPLTDTGH ERQSEGSFSPQLQESVFHLLVPSVILVLLAVGGLLFY RWRRRSHQEPQRADSPLEQPEGSPLTQDDRQVELPV
207	M-CSF мышцы	MTARGAAGRCPSSTWLGSRLLLVCLLMSRSIAKEVS EHCSHMIGNGHLKVLQQLIDSQMETSCQIAFEFVDQ EQLDDPVCYLKKAFFLVQDIIDETMRFKDNTPNANA TERLQELSNNLNSCFTKDYEEQNKACVRTFHETPLQ LLEKIKNFFNETKNLLEKDOWNIFTKNCNNSFAKCSSR DVVTKPDCNCLYPKATPSSDPASASPHQPPAPSMAPL AGLAWDDSQRTGSSLLPSELPLRIEDPGSAKQRPPR STCQTLESTEQPNHGDRLTEDSQPHPSAGGPVPGVED ILESSLGTNWVLEEASGEASEGFLTQEAKFSPSTPVG GSIQAETDRPRALSASFPFKSTEDQKPVDITDRPLTEV NPMRPIGQTQNNTPKTDGTSTLREDHQEPGSPHIAT PNPQRVSNSATPVAQLLLPKSHSWGIVLPLGELEGKR STRDRRSPAEEGGPASEGAARPVARFNSIPLTDTGH VEQHEGSSDPQIPESVFHLLVPGIILVLLTVGGLLFYK WKWRSHRDPQTLDSSVGRPEDSSLTQDEDRQVELPV
208	MSP человека	MGWLPLLLLLLTQCLGVPGQRSPLNDFQVLRGTELQH LLHAVVPGPWQEDVADAEECAGRCGPLMDCRAFH YNVSSHGCQLLPWTQHSPHTRLRRSGRCDLFQKKD YVRTCIMNNGVGYRGTMTTVGGLPCQAWSHKFPN DHKYTPTLRNGLEENFCRNPDGDPGGPWCYTTDPA VRFQSCGIKSCREAAVCWCNGEEYRGAVDRTESGRE CQRWDLQHPHQHPFEPGKFLDQGLDDNYCRNPDGS ERPWCYTTPQIEREFCDLPRCGSEAQPRQEATTVSC FRGKGEGYRGTANTTTAGVPCQRWDAQIPHQHRFT PEKYACKDLRENFCRNPDGSEAPWCFTLRPGMRAAF CYQIRRCTDDVRPQDCYHGAGEQYRGTVSKTRKGV QCQRWSAETPHKPQFTFTSEPHAQLEENFCRNPDGD SHGPWCYTMDPRTPFDYCALRRCADDQPPSILDPPD QVQFEKCGKRVDRLDQRRSKLRVVGGHGPGNSPWTV SLRNRQGQHFCGGSLVKEQWILTARQCFSSCHMPLT

		GYEVWLGTLFQNPQHGEPSLQRVPVAKMVCGPSGS QLVLLKLETSVTNLNQRVALICLPPEWYVVPPTKCEI AGWGETKGTGNDTVLNVALLNVISNQEENIKHRGR VRESEMCTEGLLAPVGACEGDYGGPLACFTHNCWV LEGHIIPNRVCARSRWPAVFTRVSVFVDWIHKVMRLG
209	MSP мышцы	MGLPLPLLQSSLLMLLLRLSAASTNLNWQCPRIPIYA ASRDFSVKYVVPFSAGGRVQATAAYEDSTNSAVFV ATRNHLHVLGPDQLFIENLTGPIGNPGCQTCASCGP GPHGPPKDDTLVLVMEPGLPALVSCGSTLQGRCLF HELEPRGKALHLAAPACLFSAANNKPEACTDCVASP LGTRVTVVEQGHASYFYVASSLDPELAASFSPRSVSI RRLKSDTSGFQPGFSLSVLPKYLASYLIKYVVSFHS GDFVYFLTVQPISVTSPPSALHTRLVRLNAVEPEIGD YRELVLDCHFAPKRRRRGAPEGTQPYPLQAAHSAP VDAKLAVELISSEGQEVLFVFTVKDGGSGMGPNNS VVCAFPYHLNILIEEGVEYCCHSSNSSSLLSRGLDF QTPSFCPNPPGGEASGPSSRCHYFPLMVHASFTRVDL FNGLLSVKVTALHVTNLGNVTVAHMGTVDGRVLQ VEIARSLNYLLYVSNFLGSSGQPVHRDVSRLGNDLL FASGDQVFKVPIQGPGCRHFLTCWRCLRAQRFMGC GWCGRCDRQKECPGSWQQDHCPPEISEFYPHSGPL RGTTRLTLCGSNFYLRPDDVVEGTHQITVGQSPCRL LPKDSSSPRPGSLKEFIQELECELEPLVTQAVGTTNIS LVITNMPAGKHFRVEGISVQEGFSFVEPVLTSIKPDFG PRAGGTYLTEGQSLSVGTSRAVLVNGTQCRLEQVN EEQILCVTPPGAGTARVPLHLQIGGAEVPGSWTFHY KEDPIVLDISPKCGYSGSHIMIHGQHLTSAWHFTLSF HDGQSTVESRCAGQFVEQQRRRCRLPEYVVRNPQG WATGNLSVWGDGAAGFTLPGFRFLPPPSPLRAGLVE LKPEEHSVKVEYVGLGAVADCVTVNMTVGGEVCQ HELRGDVVICPLPPSLQLGKDGVPPLQVCVDGGCHILS QVVRSSPGRASQRILLIALLVILLVAVLAVALIFNSR RRKKQLGAHSLSPITLSDINDTASGAPNHEESSES RDTSVPLLRTEIIRLQDLDRMLLAEVKDVLPHEQVVI

		HTDQVIGKGHFGVVYHGEYTDGAQNQTHCAIKSLS RITEVQEVEAFLREGLLMRGLHHPNILALIGIMLPPEG LPRVLLPYMRHGDLLHFIRSPQRNPTVKDLVSFGLQ VACGMEYLAEQKFVHRDLAARNCMLDESFTVKVA DFGLARGVLDKEYYSVRQHRHARLPVKWMALESLO TYRFTTKSDVWSFGVLLWELLTRGAPPYPHIDPFDLS HFLAQGRRLPQPEYCPDSLYHVMLRCWEADPAARP TFRALVLEVKQVVASLLGDHYVQLTAAYVNVGPRA VDDGSVPPEQVQPSPQHCRSTSKPRPLSEPPLPT
210	Линкер	GSSGGSGGSGG
211	Линкер	GGGSGGGS
212	Линкер	GGGSGGSGGGS
213	Линкер	GGGGSGGGSGGGGS
214	Линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
215	Линкер	GGGGSGGGGS
216	Линкер	(GGGGS)n
217	Линкер	GGGGSGS
218	Линкер	GGGGSGGGSGGGSGGS
219	Линкер	GGSLDPKGGGGS
220	Линкер	PKSCDKTHTCPPCPAPELLG
221	Линкер	SKYGPPCPPCPAPEFLG
222	Линкер	GKSSGSGSESKS
223	Линкер	GSTSGSGKSSEGKG
224	Линкер	GSTSGSGKSSEGSSTKG
225	Линкер	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
226	Линкер	GSTSGSGKPGSSEGST
227	Линкер	(GSGGS)n
228	Линкер	(GGGS)n
229	Линкер	GGSG
230	Линкер	GGSGG
231	Линкер	GSGSG
232	Линкер	GSGGG
233	Линкер	GGGSG

234	Линкер	GSSSG
235 – 244	(намеренно исключено)	(намеренно исключено)
245	Линкер	GPQG TAGQ
246 – 249	(намеренно исключено)	(намеренно исключено)
250	Линкер	YGAG LGW
251 – 262	(намеренно исключено)	(намеренно исключено)
263	CM	APRSALAHGLF
264	CM	AQNLLGMY
265	CM	LSGRSDNHGGA VGLLAPP
266	CM	VHMPLGFLGP GGLSGRSDNH
267	CM	LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP
268	CM	LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS
269	CM	ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH
270	CM	LSGRSDNHGGSGGSQLRMA
271	CM	QSQLRMAGGSGGSLSGRSDNH
272	CM	LSGRSGNHGGSGGSQLRMA
273	CM	QSQLRMAGGSGGSLSGRSGNH
274	CM	ISSGLLSGRSGNH
275	CM	AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG
276	CM	TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP
277	CM	VHMPLGFLGP GGTSTSGRSANPRG
278	CM	TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP
279	CM	LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS
280	Расщепляемая последовательность	PRFKIIGG
281	Расщепляемая последовательность	PRFRIIGG
282	Расщепляемая последовательность	SSRHRRALD
283	Расщепляемая	RKSSIIIRMRDVVL

	последовательность	
284	Расщепляемая последовательность	SSSFDKGKYKKGDDA
285	Расщепляемая последовательность	SSSFDKGKYKRGDDA
286	Расщепляемая последовательность	IEGR
287	Расщепляемая последовательность	IDGR
288	Расщепляемая последовательность	GGSIDGR
289	Расщепляемая последовательность	PLGLWA
290	Расщепляемая последовательность	GPQGIAGQ
291	Расщепляемая последовательность	GPQGLLGA
292	Расщепляемая последовательность	GIAGQ
293	Расщепляемая последовательность	GPLGIAGI
294	Расщепляемая последовательность	GPEGLRVG
295	Расщепляемая последовательность	YGAGLGVV
296	Расщепляемая последовательность	AGLGVVER
297	Расщепляемая последовательность	AGLGISST
298	Расщепляемая последовательность	EPQALAMS
299	Расщепляемая последовательность	QALAMSAI

300	Расщепляемая последовательность	AA YHLVSQ
301	Расщепляемая последовательность	MDAFLESS
302	Расщепляемая последовательность	ESLPVVAV
303	Расщепляемая последовательность	SAPAVESE
304	Расщепляемая последовательность	DVAQFVLT
305	Расщепляемая последовательность	VAQFVLT
306	Расщепляемая последовательность	VAQFVLTE
307	Расщепляемая последовательность	AQFVLTEG
308	Расщепляемая последовательность	PVQPIGPQ
309	IFN- α 2b-1204dL- hIgG4	METDTLLLWVLLLWVPGSTGCDLPQTHSLGSRRTL MLLAQMRRISLFSCCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAE TIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQ RITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESL RSKESGRSDNIGGGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
310	IFN- α -1204dL-hIgG4 (полинуклеотид)	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCT TTTGTGGGTGCCAGGATCCACAGGCTGTGATCTGC CTCAAACGCATTCATTGGGGTCCAGGCGCACGCTT ATGTTGCTTGACAGATGAGGAGAATATCACTTTT

		CTCTTGCTTGAAGGACCGCCACGATTTTGGCTTTC CGCAGGAAGAGTTTCGGTAACCAGTTCCAAAAGGC AGAGACAATCCCCGTTTTGCATGAGATGATCCAAC AGATCTTTAACCTGTTTTCAACCAAGGATAGCAGC GCAGCGTGGGATGAGACACTGCTTGACAAGTTTTA CACCGAGCTCTATCAGCAACTTAATGATCTCGAAG CCTGCGTAATTCAAGGAGTAGGCGTTACAGAGAC ACCTTTGATGAAGGAGGATTCCATCCTTGCAGTAA GAAAATACTTCCAGAGGATCACCTCTACCTCAAA GAAAAGAAATACTCCCCATGCGCGTGGGAAGTAG TGCGAGCTGAAATAATGCGGAGCTTTTCTTTGTCA ACTAATCTCCAAGAATCTCTGAGAAGCAAGGAGT CAGGTAGGTCTGATAATATCGGGGGAGGTTCTGA ATCTAAGTACGGCCCTCCTTGTCCTCCATGTCCTGC TCCAGAGTTTCTCGGAGGCCCCCTCCGTGTTCTGT TCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCA GAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGACGTT TCACAAGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGAC CAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTAC AGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA TTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG TCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAAA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGGGAACC CCAGGTTTACACACTGCCACCTAGCCAAGAGGAA ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGT CAAGGGCTTTTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAAT GGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAA GACCACACCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCAT TCTTCCTGTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGC AGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCG TGATGCACGAGGGCCCTGCACAACCACTACACCCA GAAGTCTCTGAGCCTGAGCTGA
311	IFN- α 2b-1490DNI-	METDTLLLWVLLLWVPGSTGCDLPQTHSLGSRRTL

	hIgG4	MLLAQMRRLSFLSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAE TIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQ RITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESL RSKEISSGLLSGRSDNIGGGSESKYGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS
312	IFN- α 2b-1490DNI- hIgG4 (полинуклеотид)	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCT TTTGTGGGTGCCAGGATCCACAGGCTGTGATCTGC CTCAAACGCATTTCATTGGGGTCCAGGCGCACGCTT ATGTTGCTTGACAGATGAGGAGAATATCACTTTT CTCTTGCTTGAAGGACCGCCACGATTTTGGCTTTC CGCAGGAAGAGTTCGGTAACCAGTTCCAAAAGGC AGAGACAATCCCCGTTTTGCATGAGATGATCCAAC AGATCTTTAACCTGTTTTCAACCAAGGATAGCAGC GCAGCGTGGGATGAGACACTGCTTGACAAGTTTTA CACCGAGCTCTATCAGCAACTTAATGATCTCGAAG CCTGCGTAATTCAAGGAGTAGGCGTTACAGAGAC ACCTTTGATGAAGGAGGATTCCATCCTTGCAGTAA GAAAATACTTCCAGAGGATCACCTCTACCTCAAA GAAAAGAAATACTCCCCATGCGCGTGGGAAGTAG TGCAGCTGAAATAATGCGGAGCTTTTCTTTGTCA ACTAATCTCCAAGAATCTCTGAGAAGCAAGGAGA TTAGTTCTGGCCTGCTGTCAGGTAGGTCTGATAAT ATCGGGGGAGGTTCTGAATCTAAGTACGGCCCTCC TTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGTTTCTCGGAG GCCCCTCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAG GACACCCTGATGATCAGCAGAACCCTGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTCGACGTTTCAACAAGAGGACCCC GAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGG

		AAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGA ACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGC TGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAA AGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTG CCTAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCA AGGGCCAGCCAAGGGAACCCAGGTTTACACACT GCCACCTAGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTACCC CTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGC CAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCTGT GCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCA GACTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGG CAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCC TGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTG AGCTGA
313	ProC440 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLDDKFFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPL MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAE IMRSFSLSTNLQESLRSKESGRSDNICPPCPAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
314	Первый мономер PROC657 (мутация выступа) без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLDDKFFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPL MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAE IMRSFSLSTNLQESLRSKESGRSDNICPPCPAPEFEGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE

		PQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
315	Fc IgG человека с мутацией выступа	CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLG
316	Fc IgG человека с мутацией впадины	CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFYQKSLSL SLG
317	фрагмент отрезка	SDNI
318	Линкер	GSSGGS
319	Линкер	ESKY
320	ProC286 без сигнальной последовательности	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSGGGGSGRSDNIGGGSCDLPQTHSLGSR RTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQ KAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFY TELYQQNLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVRK YFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQ ESLRSKE
321	Линкер	SGGG
322	Второй мономер	SDNICPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

	PROC657 (мутация впадины) без сигнальной последовательности	CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQ KSLSLSLG
323	Последовательность PRO859 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFCLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFTTKDSSA AWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETP LMNVDSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRA EIMRSLSLSTNLQERLRRKELSGRSDNICPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
324	Универсальная последовательность IFN-альфа A/D	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFCLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFTTKDSSA AWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETP LMNVDSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRA EIMRSLSLSTNLQERLRRKE
325	Интерферон бета, цепь А, человеческий (1AU1)	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDR MNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIF RQDSSSTGWNENIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKL EKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSH CAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGILRN
326	IFNB_CHICK Q90873.1	MTANHQSPGMHSILLLLLLPALTTTFSCNHLRHQDA NFSWKSLLQNTAPPPQPCPQQDVTFPPPETL LKSKDKKQAAITTLRILQHFLNMLSSPHTPKHWIDRT RHSLNLIQHYIHHLEQCFVNQGTRSQRGRPRN AHLNINKYFRSIHNFLLQHNHNSACTWDHVRLLQARDC FRHVDTLIQWMKSRAPLTASSKRLNTQ

327	IFNA3_CANLF O97945.1	MALPCSFVALVLLSCHSLCCLACHLPDTHSLRNWR VLTLGQMRRLSASSCDHYTTDFAFPKEFDGQR LQEAQALSVVHVMTQKVHFLCTNTSSAPWNMTLL EELCSGLSEQLDDLDACPLQEAGLAETPLMHEDST LRTYFQRISLYLQDRNHSPCAWEMVRAEIGRSFFSLT ILQERVRRRK
328	IFN_ANAPL P51526.1	MPGPSAPPPPAIYSALALLLLTPPANAFSCSPLRLHD SAFAWDSLQLLRNMAPSPTQPCPQQHAPCSFP DTLLDTNDTQQAHAHTALHLLQHFLDTLSSPSTPAHW LHTARHDLLNQLQHIIHHLERCFPADAARLHRRG PRNLHLSINKYFGCIQHFLQNHTYSPCAWDHVRLEA HACFQRIHRLTRTMR
329	IFNAH_BOVIN P49878.1	MAPAWSFLLALLLLSCNAICSLGCHLPHTHSLPNRRV LTLLRQLRRVSPSSCLQDRNDFAFPQEALGGSQ LQKAQAISVLHEVTQHTFQLFSTEGSAAAWDESLLD KLRAALDQQLTDLQACLRQEEGLRGAPLKEDAS LAVRKYFHRLTLYLREKRHNPCAWEVVRAEVMRAF SSSTNLQERFRRKD
330	IFNA1_CHICK P42165.1	MAVPASPQHPRGYGILLTLLKALATTASACNHRLR PQDATFSHDSLQLLRDMAPTLPLQLCPQHNASCSE NDTILDTSNTRQADKTTHDILQHFLKILSSPSTPAHW NDSQRQSLNRIHRYTQHLEQCLDSSDTRSRTR WPRNLHLTIKKHFSCLHTFLQDNDYSACAWEHVRL QARAWFLHIHNLTGNTRT
331	IFNA_FELCA P35849.1	MALPSSFLVALVALGCNSVCSLGCPLPQTHGLLNRR ALTLLGQMRRLPASSCQKDRNDFAFPQDVFGGDQ SHKAQALSVVHVNTNQKIFHFFCTEASSSAWNTTLL EEFCTGLDRQLTRLEACVLQEVEEGEAPLTNEDI HPEDSILRNYFQRLSLYLQEKKYSPCAWEIVRAEIMR SLYYSSTALQKRLRSEK
332	Интерферон бета 1 [Sus scrofa] AAA31056.1	MANKCILQIALLMCFSTTALSMSYDVLRYQQRSSNL ACQKLLGQLPGTPQYCLEDNMNFEVPPEIMQPPQ FQKEDAVLIHEMLQQIFGILRRNFSSTGWNETVIKTI LVELDGQMDDLETILEEIMEEENFPRGDMTIL

		HLKKYYLSILQYLKSKEYRSCAWTVVQVEILRNFSFL NLTDYLRN
333	IFNB2_BOVIN P01576.1	MTHRCLLQMVLLLCFSTTALSRSYSLLRFFQQRSLA LCQKLLRQLPSTPQHCLARMDFQMPEEMKQAQQ FQKEDAILVIYEMLQQIFNILTRDFSSTGWSETIIEDLL EELYEQMNHLEPIQKEIMQKQNSTMGDTTVL HLRKYYFNLVQYLKSKEYNRCAWTVVRVQILRNFS FLTRLTGYLE
334	Цепь А, ИНТЕРФЕРОН- АЛЬФА 2В 1RH2	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFCLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTK DSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDEACVIQGVGV TETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVRRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
335	Линкер	SGGGG
336	ProC288 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFCLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLLDKFYTELYQQLNDEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVR AEIMRSFSLSTNLQESLRSKE <u>SGGGGSGRSDNI</u> CP PC PAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
337	ProC289 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFCLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLLDKFYTELYQQLNDEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVR AEIMRSFSLSTNLQESLRSKE <u>SGGGGSGRSDNI</u> GPP C PPC PAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY

		PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
338	ProC290 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPL MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAE IMRSFSLSTNLQESLRSKESGGGGSGRSDNIESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LS
339	ProC291 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPL MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAE IMRSFSLSTNLQESLRSKESGGGGSGRSDNIGGGSES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLS
340	ProC441 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPL MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAE IMRSFSLSTNLQESLRSKESGRSDNIGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNA
341	ProC442 без	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSLKDRHDF

	сигнальной последовательности	GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLDDKIFYTELYQQNDLEACVIQGVGVTTETPL MKEDSILAVRKIFYQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAE IMRSFSLSTNLQESLRSKESGRSDNIESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
342	ProC443 без сигнальной последовательности	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFCLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA AWDETLDDKIFYTELYQQNDLEACVIQGVGVTTETPL MKEDSILAVRKIFYQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAE IMRSFSLSTNLQESLRSKESGRSDNIGGGSESKYGPCC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL S
343	Сигнальная последовательность	MRAWIFFLLCLAGRALA
344	Сигнальная последовательность	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVG
345	Сигнальная последовательность	METDTLLLWVLLLWVPGSTG

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Следует понимать, что хотя настоящее изобретение было описано в сочетании с его подробным описанием, приведенное выше описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем настоящего изобретения, который определен объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и

модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС), которая содержит первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, где:

(а) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый цитокиновый белок (CP1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1),

при этом CM1 расположен между CP1 и DD1; и

(б) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый цитокиновый белок (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2),

при этом CM2 расположен между CP2 и DD2; или

(а) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый цитокиновый белок (CP1), первый домен димеризации (DD1), и

(б) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый цитокиновый белок (CP2), расщепляемый фрагмент (CM) и второй домен димеризации (DD2), при этом CM расположен между CP2 и DD2, при этом CM функционирует в качестве субстрата для протеазы; или

(а) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый цитокиновый белок (CP1), расщепляемый фрагмент (CM) и первый домен димеризации (DD1), при этом CM расположен между CP1 и DD1, и

(б) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый цитокиновый белок (CP2) и второй домен димеризации (DD2),

при этом CM функционирует в качестве субстрата для протеазы; или

(а) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый цитокиновый белок (CP1) и первый домен димеризации (DD1), и

(б) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый цитокиновый белок (CP2) и второй домен димеризации (DD2), при этом CP1, CP2 или как CP1, так и CP2 содержит(ат) аминокислотную последовательность, которая функционирует в качестве субстрата для протеазы;

при этом (с) DD1 и DD2 связываются друг с другом, за счет чего образуется димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и

при этом (d) АСС характеризуется сниженным уровнем из по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем из по меньшей мере одной активности CP1 и/или CP2.

2. АСС по п. 1, отличающаяся тем, что указанная первая мономерная конструкция содержит первый полипептид, который содержит CP1, CM1 и DD1.
3. АСС по любому из п. 1 или п. 2 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанная вторая мономерная конструкция содержит второй полипептид, который содержит CP2, CM2 и DD2.
4. АСС по любому из пп. 1-3 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные DD1 и DD2 представляют собой пару, выбранную из группы, состоящей из пары Fc-доменов, домена sushi из альфа-цепи рецептора IL-15 человека (IL15R α) и растворимого IL-15; барназы и барстара; PKA и AKAP; модулей тегов адаптер/докинг на основе мутированных фрагментов РНКазы I; эпитопа и sdAb; эпитопа и scFv; и модулей SNARE на основе взаимодействий белков синтаксина, синаптотагмина, синаптобревина и SNAP25, антигенсвязывающего домена и эпитопа.
5. АСС по п. 4, отличающаяся тем, что указанные DD1 и DD2 представляют собой пару Fc-доменов.
6. АСС по п. 5, отличающаяся тем, что указанная пара Fc-доменов представляет собой пару Fc-доменов человека.
7. АСС по п. 6, отличающаяся тем, что указанные Fc-домены человека представляют собой Fc-домены IgG1 человека, Fc-домены IgG2 человека, Fc-домены IgG3 человека или Fc-домены IgG4 человека.
8. АСС по п. 7, отличающаяся тем, что указанные Fc-домены человека представляют собой Fc-домены IgG4 человека.
9. АСС по п. 8, отличающаяся тем, что указанные Fc-домены человека содержат последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 315 или SEQ ID NO: 316.

10. АСС по п. 9, отличающаяся тем, что указанные Fc-домены человека содержат последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 315 или SEQ ID NO: 316.
11. АСС по п. 10, отличающаяся тем, что указанные Fc-домены человека содержат SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 315 или SEQ ID NO: 316.
12. АСС по любому из пп. 1-3 и 5-11 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные DD1 и DD2 являются одинаковыми.
13. АСС по п. 4, отличающаяся тем, что указанный DD1 содержит антигенсвязывающий домен, а DD2 содержит соответствующий эпитоп.
14. АСС по п. 13, отличающаяся тем, что указанный антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен к His-тегу, и при этом DD2 содержит His-тег.
15. АСС по п. 13, отличающаяся тем, что указанный антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).
16. АСС по п. 13, отличающаяся тем, что указанный антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb).
17. АСС по п. 1, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из указанных DD1 и DD2 содержит заместитель домена димеризации, выбранный из группы, состоящей из неполипептидного полимера и малой молекулы.
18. АСС по п. 17, отличающаяся тем, что указанные DD1 и DD2 содержат неполипептидные полимеры, ковалентно связанные друг с другом.
19. АСС по п. 18, отличающаяся тем, что указанный неполипептидный полимер представляет собой серосодержащий полиэтиленгликоль, и при этом DD1 и DD2 ковалентно связаны друг с другом посредством одной или нескольких дисульфидных связей.

20. АСС по п. 17, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из DD1 и DD2 содержит малую молекулу.
21. АСС по п. 20, отличающаяся тем, что малая молекула представляет собой биотин.
22. АСС по п. 20, отличающаяся тем, что указанный DD1 содержит биотин, а DD2 содержит авидин.
23. АСС по любому из пп. 1-22 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный(ые) CP1 и/или CP2, каждый в отдельности, выбран(ы) из группы, состоящей из интерферона, интерлейкина, GM-CSF, G-CSF, LIF, OSM, CD154, LT- β , TNF- α , TNF- β , 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE, TGF- β 1, TGF- β 1, TGF- β 3, Еро, Тро, Flt-3L, SCF, M-CSF и MSP.
24. АСС по любому из пп. 1-23 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные CP1 и CP2 являются одинаковыми.
25. АСС по любому из пп. и 1-23 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные CP1 и CP2 являются разными.
26. АСС по любому из пп. и 1-23 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный(ые) CP1 и/или CP2 представляет(ют) собой интерферон.
27. АСС по п. 26, отличающаяся тем, что указанные CP1 и CP2 представляют собой интерферон.
28. АСС по п. 26, отличающаяся тем, что указанные CP1 и CP2 представляют собой разные интерфероны.
29. АСС по п. 26, отличающаяся тем, что указанные CP1 и CP2 представляют собой одинаковый интерферон.

30. АСС по п. 26, отличающаяся тем, что указанный CP1 или CP2 представляет собой интерферон.
31. АСС по любому из пп. 26-30 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный(е) интерферон(ы) представляет(ют) собой зрелый интерферон человека дикого типа.
32. АСС по любому из пп. 26-31 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный(е) интерферон(ы) выбран(ы) из группы, состоящей из интерферона-альфа, интерферона-бета, интерферона-омега и интерферона-тау.
33. АСС по п. 32, отличающаяся тем, что указанный(е) интерферон(ы) представляет(ют) собой интерферон-альфа.
34. АСС по п. 33, отличающаяся тем, что интерферон(ы) выбран(ы) из группы, состоящей из интерферона альфа-2а, интерферона альфа-2b и интерферона альфа-n3.
35. АСС по п. 34, отличающаяся тем, что указанный(е) интерферон(ы) представляет(ют) собой интерферон альфа-2b.
36. АСС по п. 35, отличающаяся тем, что указанный(ые) CP1 и/или CP2 содержит(ат) последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 1.
37. АСС по п. 36, отличающаяся тем, что указанный(ые) CP1 и/или CP2 содержит(ат) последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 1.
38. АСС по п. 37, отличающаяся тем, что указанный(ые) CP1 и/или CP2 содержит(ат) последовательность SEQ ID NO: 1.
39. АСС по п. 32, отличающаяся тем, что указанный интерферон представляет

собой интерферон бета.

40. АСС по п. 39, отличающаяся тем, что указанный интерферон бета выбран из группы, состоящей из интерферона бета-1a и интерферона бета-1b.
41. АСС по любому из пп. 1-40, отличающаяся тем, что указанный(ые) СР1 и/или СР2 содержит(ат) домен IFab.
42. АСС по п. 41, отличающаяся тем, что указанный(ые) СР1 и/или СР2 содержит(ат) интерлейкин.
43. АСС по п. 42, отличающаяся тем, что указанный интерлейкин выбран из группы, состоящей из IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-18, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-10, IL-20, IL-14, IL-16 и IL-17.
44. АСС по любому из пп. 1-43 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный(ые) СМ1 и/или СМ2 содержит(ат) в целом от приблизительно 3 аминокислот до приблизительно 15 аминокислот.
45. АСС по любому из пп. 1-44 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные СМ1 и СМ2 содержат субстраты для разных протеаз.
46. АСС по любому из пп. 1-44 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные СМ1 и СМ2 содержат субстраты для одной и той же протеазы.
47. АСС по любому из пп. 1-46 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанная(ые) протеаза(ы) выбрана(ы) из группы, состоящей из ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, BACE, ренина, катепсина D, катепсина E, каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 14, катепсина B, катепсина C, катепсина K, катепсина L, катепсина S, катепсина V/L2, катепсина X/Z/P, крузипаина, легумаина, отубаина-2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, KLK14, меприна, неприлизина, PSMA, BMP-1, MMP-1, MMP-2,

MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-24, MMP-26, MMP-27, активированного белка C, катепсина А, катепсина G, химазы, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, эластазы, гранзима В, гуанидинобензоатазы, HtrA1, нейтрофиллиазы человека, лактоферрина, марапсина, NS3/4A, PACE4, плазмина, PSA, tPA, тромбина, триптазы, uPA, DESC1, DPP-4, FAP, гепсина, матриптазы-2, MT-SP1/матрипазы, TMPRSS2, TMPRSS3 и TMPRSS4.

48. ACC по п. 47, отличающаяся тем, что протеаза(ы) выбрана(ы) из группы, состоящей из uPA, легумайна, MT-SP1, ADAM17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13 и MMP-14.
49. ACC по п. 47, отличающаяся тем, что указанный(ые) CM1 и/или CM2 содержит(ат) последовательность, выбранную из группы, состоящей из LSGRSDNH (SEQ ID NO: 5), TGRGPSWV (SEQ ID NO: 6), PLTGRSGG (SEQ ID NO: 7), TARGPSFK (SEQ ID NO: 8), NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 9), NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 10), TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 11), TSGRSANP (SEQ ID NO: 12), VHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 13), AVGLLAPP (SEQ ID NO: 14), AQNLLGMV (SEQ ID NO: 15), QNQALRMA (SEQ ID NO: 16), LAAPLGLL (SEQ ID NO: 17), STFPFGMF (SEQ ID NO: 18), ISSGLLSS (SEQ ID NO: 19), PAGLWLDP (SEQ ID NO: 20), VAGRSMRP (SEQ ID NO: 21), VVPEGRRS (SEQ ID NO: 22), ILPRSPAF (SEQ ID NO: 23), MVLGRSLL (SEQ ID NO: 24), QGRAITFI (SEQ ID NO: 25), SPRSIMLA (SEQ ID NO: 26), SMLRSMPL (SEQ ID NO: 27), ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 29), ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 30), LSGRSGNH (SEQ ID NO: 31), SGRSANPRG (SEQ ID NO: 32), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), LSGRSDIH (SEQ ID NO: 34), LSGRSDQH (SEQ ID NO: 35), LSGRSDTH (SEQ ID NO: 36), LSGRSDYH (SEQ ID NO: 37), LSGRSDNP (SEQ ID NO: 38), LSGRSANP (SEQ ID NO: 39), LSGRSANI (SEQ ID NO: 40), LSGRSDNI (SEQ ID NO: 41), MIAPVAYR (SEQ ID NO: 42), RPSPMWAY (SEQ ID NO: 43), WATPRPMR (SEQ ID NO: 44), FRLLDWQW (SEQ ID NO: 45), ISSGL (SEQ ID NO: 46), ISSGLLS (SEQ ID NO: 47), ISSGLL (SEQ ID NO: 48), ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 49), AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 50), AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID

NO: 51), ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 52), ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 53), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 55), ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 56), ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 57), ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 58), ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 59), AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 60), AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 61), AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 62), AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 63), AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 64), AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 65), AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 66), AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 67), ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68), AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 69), GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 70), GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 71), LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 72), ISSGLSS (SEQ ID NO: 73), PVGYTSSL (SEQ ID NO: 74), DWLYWPGI (SEQ ID NO: 75), LKAAPRWA (SEQ ID NO: 76), GPSHLVLT (SEQ ID NO: 77), LPGGLSPW (SEQ ID NO: 78), MGLFSEAG (SEQ ID NO: 79), SPLPLRVP (SEQ ID NO: 80), RMHLRSLG (SEQ ID NO: 81), LLAPSHRA (SEQ ID NO: 82), GPRSFGL (SEQ ID NO: 83), GPRSFG (SEQ ID NO: 84), SARGPSRW (SEQ ID NO: 85), GGWHTGRN (SEQ ID NO: 86), HTGRSGAL (SEQ ID NO: 87), AARGPAIH (SEQ ID NO: 88), RGPATPIM (SEQ ID NO: 89), SSRGPAYL (SEQ ID NO: 90), RGPATPIM (SEQ ID NO: 91), RGPA (SEQ ID NO: 92), GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 93), FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 94), SPLTGRSG (SEQ ID NO: 95), SAGFSLPA (SEQ ID NO: 96), LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 97), SGGPLGVR (SEQ ID NO: 98), PLGL (SEQ ID NO: 99) и SGRSDNI (SEQ ID NO: 100).

50. ACC по п. 47, отличающаяся тем, что указанный(ые) CM1 и/или CM2 содержит(ат) последовательность, выбранную из группы, состоящей из ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 28), LSGRSDDH (SEQ ID NO: 33), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 54), SGRSDNI (SEQ ID NO: 100) и ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 68).
51. ACC по любому из пп. 1-50 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный(ые) CM1 и/или CM2 содержит(ат) последовательность, выбранную из SEQ ID No: 5-100 и 263-308.

52. АСС по любому из пп. 1-51 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанная(ые) протеаза(ы) продуцируется(ются) опухолью в организме субъекта.
53. АСС по п. 52, отличающаяся тем, что указанный субъект был диагностирован или идентифицирован как имеющий рак.
54. АСС по любому из пп. 1-53 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные CP1 и CM1 непосредственно примыкают друг к другу в первой мономерной конструкции.
55. АСС по любому из пп. 1-54 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу в первой мономерной конструкции.
56. АСС по любому из пп. 1-55 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные CP2 и CM2 непосредственно примыкают друг к другу во второй мономерной конструкции.
57. АСС по любому из пп. 1-56 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные CM2 и DD2 непосредственно примыкают друг к другу во второй мономерной конструкции.
58. АСС по любому из пп. 1-57 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанная первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер.
59. АСС по п. 58, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один линкер представляет собой линкер L1, расположенный между CP1 и CM1, и/или линкер L2, расположенный между CM1 и DD1.
60. АСС по п. 59, отличающаяся тем, что указанная вторая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер.

61. АСС по п. 60, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один линкер представляет собой линкер L3, расположенный между CP2 и CM2, и/или линкер L4, расположенный между CM2 и DD2.
62. АСС по п. 61, отличающаяся тем, что указанная первая мономерная конструкция содержит линкер L1, а вторая мономерная конструкция содержит линкер L3.
63. АСС по п. 62, отличающаяся тем, что указанные L1 и L3 являются одинаковыми.
64. АСС по п. 63, отличающаяся тем, что указанная вторая мономерная конструкция содержит линкер L2, а вторая мономерная конструкция содержит линкер L4.
65. АСС по п. 64, отличающаяся тем, что указанные L2 и L4 являются одинаковыми.
66. АСС по п. 65, отличающаяся тем, что каждый указанный линкер имеет общую длину от 1 аминокислоты до приблизительно 15 аминокислот.
67. АСС по п. 66, отличающаяся тем, что каждый указанный линкер имеет общую длину, составляющую по меньшей мере 5 аминокислот.
68. АСС по любому из пп. 1-67 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанная первая мономерная конструкция содержит по меньшей мере один линкер, при этом каждый линкер независимо выбран из группы, состоящей из GSSGSGGSGG (SEQ ID NO: 210); GGGS (SEQ ID NO: 2); GGGSGGGS (SEQ ID NO: 211); GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 212); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213); GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214); GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 215); GGGGS (SEQ ID NO: 216); GS; GGGGSGS (SEQ ID NO: 217); GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO: 218); GGS LDPKGGGGS (SEQ ID NO: 219); PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 220); SKYGPPCPPCPAPEFLG (SEQ ID NO: 221); GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 222); GSTSGSGKSSEGGK (SEQ ID NO: 223); GSTSGSGKSSEGGSGSTKG

(SEQ ID NO: 224); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 225); GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226); (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 227), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 228), (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 216), где каждый *n* представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере один; GGSG (SEQ ID NO: 229); GGSGG (SEQ ID NO: 230); GSGSG (SEQ ID NO: 231); GSGGG (SEQ ID NO: 232); GGGSG (SEQ ID NO: 233); GSSSG (SEQ ID NO: 234); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 213); GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 214); and GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO: 226).

69. ACC по п. 68, отличающаяся тем, что указанный линкер содержит последовательность GGGS (SEQ ID NO: 2).
70. ACC по любому из пп. 1-69 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанная первая мономерная конструкция содержит в направлении от N- к С-концу CP1, CM1 и связана непосредственно или опосредованно с С-концом CM1, DD1.
71. ACC по любому из пп. 1-70 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный первый полипептид содержит в направлении от С- к N-концу CP1, CM1 и связана непосредственно или опосредованно с N-концом CM1, DD1.
72. ACC по любому из пп. 1-71 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный второй полипептид содержит в направлении от N- к С-концу CP2, CM2 и связана непосредственно или опосредованно с С-концом CM2, DD2.
73. ACC по любому из пп. 1-72 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный второй полипептид содержит в направлении от С- к N-концу CP2, CM2 и связана непосредственно или опосредованно с CM2, DD2.
74. ACC по п. 70, отличающаяся тем, что указанная первая мономерная конструкция содержит в направлении от N- к С-концу CP1, CM1 и DD1, при этом CP1 и CM1 непосредственно примыкают друг к другу, при этом CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу, при этом CM1 представляет собой пептид, состоящий из не более чем 10 аминокислот, при этом вторая

мономерная конструкция является такой же, как первая мономерная конструкция, и при этом первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом посредством по меньшей мере двух дисульфидных связей.

75. АСС по п. 74, отличающаяся тем, что указанный CP1 представляет собой интерферон.
76. АСС по п. 75, отличающаяся тем, что указанный CP1 представляет собой интерферон-альфа.
77. АСС по любому из пп. 1-76 или их комбинации, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна из указанной активности CP1 и/или CP2 представляет собой аффинность связывания (K_D) CP1 и/или CP2 в отношении его когнатного рецептора, как определено с использованием поверхностного плазмонного резонанса.
78. АСС по любому из пп. 1-76 или их комбинации, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна из указанной активности CP1 и/или CP2 представляет собой уровень пролиферации клеток лимфомы.
79. АСС по любому из пп. 1-6 или их комбинации, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна из указанной активности CP1 и/или CP2 представляет собой уровень активации пути JAK/STAT/ISGF3 в клетке лимфомы.
80. АСС по любому из пп. 1-76 или их комбинации, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна из указанной активности представляет собой уровень продуцирования SEAP в клетке лимфомы.
81. АСС по любому из пп. 1-80 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанная АСС характеризуется по меньшей мере 20-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем.

82. АСС по п. 81, отличающаяся тем, что указанная АСС характеризуется по меньшей мере 50-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем.
83. АСС по п. 82, отличающаяся тем, что указанная АСС характеризуется по меньшей мере 100-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем.
84. АСС по п. 83, отличающаяся тем, что указанная АСС характеризуется по меньшей мере 500-кратным снижением по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 по сравнению с контрольным уровнем.
85. АСС по любому из пп. 1-84 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный контрольный уровень по меньшей мере одной из активности CP1 и/или CP2 представляет собой активность CP1 и/или CP2 в АСС после воздействия на АСС протеазы(протеаз).
86. АСС по любому из пп. 1-84 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный контрольный уровень по меньшей мере одного из CP1 и/или CP2 представляет собой соответствующую активность CP1 и/или CP2 соответствующего зрелого цитокина дикого типа.
87. АСС по любому из пп. 1-86 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанная АСС характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия протеазы(протеаз), при этом продукт расщепления включает по меньшей мере одну из активности CP1 и/или CP2.
88. АСС по п. 87, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна из указанной активности из CP1 и/или CP2 представляет собой антипролиферативную активность.
89. АСС по п. 88, отличающаяся тем, что указанный контрольный уровень представляет собой значение EC50, и при этом соотношение EC50 (продукт расщепления) к EC50 (контрольный уровень) составляет менее приблизительно

10, или менее приблизительно 9, или менее приблизительно 8, или менее приблизительно 7, или менее приблизительно 6, или менее приблизительно 5, или менее приблизительно 4, или менее приблизительно 3, или менее приблизительно 2 или менее приблизительно 1,5.

90. Композиция, содержащая АСС по любому из пп. 1-89 или их комбинации.
91. Композиция по п. 90, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой фармацевтическую композицию.
92. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащие по меньшей мере одну дозу композиции по п. 90 или п. 91.
93. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества АСС по любому из пп. 1-89 или композиции по п. 90 или п. 91.
94. Способ по п. 93, отличающийся тем, что субъект был идентифицирован или диагностирован как имеющий рак.
95. Способ по п. 94, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой лимфому, солидную опухоль, гематологическую опухоль, саркому, остеосаркому, глиобластому, нейробластому, меланому, рабдомиосаркому, саркому Юинга, остеосаркому, В-клеточные новообразования, множественную миелому, В-клеточную лимфому, В-клеточную неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, хронический лимфолейкоз (CLL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз (CML), острый лимфолейкоз (ALL), миелодиспластические синдромы (MDS), кожную Т-клеточную лимфому, ретинобластому, рак мочевого пузыря, рак желудка, уротелиальную карциному, рак легких, рак толстой кишки, почечно-клеточный рак, рак желудка и пищевода, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак молочной железы, колоректальный рак, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак эндометрия, рак шейки матки, рак печени или гепатоцеллюлярную карциному.

96. Способ по п. 95, отличающийся тем, что указанная лимфома представляет собой лимфому Беркитта.
97. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит CP1 и CM1 АСС по любому из пп. 1-89 или их комбинации.
98. Нуклеиновая кислота по п. 97, отличающаяся тем, что указанный полипептид дополнительно содержит DD1 по любому из пп. 1-16 или пп. 23-88 или их комбинации.
99. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит CP2 и CM2 АСС по любому из пп. 1-89 или их комбинации.
100. Нуклеиновая кислота по п. 99, отличающаяся тем, что указанный полипептид дополнительно содержит DD2 по любому из пп. 1-16 или пп. 23-88 или их комбинации.
101. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 97-100 или их комбинации.
102. Вектор по п. 101, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой вектор экспрессии.
103. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 96-99 или вектор по п. 101 или п. 102.
104. Пара нуклеиновых кислот, которые совместно кодируют полипептид, который содержит CP1 и CM1 первой мономерной конструкции, и полипептид, который содержит CP2 и CM2 второй мономерной конструкции по любому из пп. 1-89 или их комбинации.
105. Пара векторов, которые совместно содержат пару нуклеиновых кислот по п. 104.

106. Пара векторов по п. 105, отличающаяся тем, что указанная пара векторов представляет собой пару векторов экспрессии.
107. Клетка, содержащая пару нуклеиновых кислот по п. 102 или пару векторов по п. 105 или п. 106.
108. Способ получения АСС, включающий:
культивирование клетки по п. 103 или п. 107 в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для получения АСС; и
извлечение АСС из белка из клеточной массы или культуральной среды.
109. Способ по п. 108, дополнительно включающий:
выделение АСС из клетки или жидкой культуральной среды.
110. Способ по п. 109, дополнительно включающий:
включение выделенной АСС в состав фармацевтической композиции.
111. АСС, полученная с помощью способа по п. 108.
112. Композиция, содержащая АСС по п. 111.
113. Композиция по п. 112, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой фармацевтическую композицию.
114. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащие по меньшей мере одну дозу композиции по п. 112 или п. 113.
115. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС), содержащая первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, при этом:
(а) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый цитокиновый белок (CP1); расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1);
(б) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый цитокиновый белок (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2);

(с) первая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий в направлении от N- к С-концу CP1, CM1 и DD1, дополнительно при этом:

(i) каждая из первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции содержит связывающую область, содержащую не более 18 аминокислот, и

(ii) CP1 представляет собой зрелый интерферон;

(d) дополнительно при этом:

(i) вторая мономерная конструкция является такой же, как и первая мономерная конструкция,

(ii) первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи, и

(iii) DD1 и DD2 представляют собой пару Fc-доменов IgG человека;

(е) DD1 и DD2 связываются друг с другом, за счет чего образуется димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и

(f) АСС характеризуется сниженным уровнем активности интерферона по сравнению с соответствующим контрольным интерфероном.

116. АСС по п. 115, отличающаяся тем, что указанный CP1 представляет собой зрелый интерферон альфа человека.

117. АСС по любому из пп. 115-116 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный зрелый интерферон представляет собой зрелый интерферон альфа-2b.

118. АСС по любому из пп. 115-117 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный зрелый интерферон представляет собой усеченную форму зрелого интерферона альфа-2b дикого типа.

119. АСС по любому из пп. 115-117 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный зрелый интерферон содержит последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 1.

120. АСС по любому из пп. 115-117 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный зрелый интерферон альфа содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

121. АСС по любому из пп. 115-120 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные CP1 и CM1 непосредственно примыкают друг к другу, и CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу, и каждый из CM1 и CM2 содержит не более 10 аминокислот, необязательно не более 7 аминокислот.
122. АСС по любому из пп. 115-121 или их комбинации, отличающаяся тем, что каждый из указанных CM1 и CM2 независимо функционирует в качестве субстрата урокиназы (uPa) и/или матриксной металлопротеиназы (MMP).
123. АСС по любому из пп. 115-122 или их комбинации, отличающаяся тем, что каждый из указанных CM1 и CM2 независимо функционирует в качестве субстрата урокиназы (uPa) и/или MMP-14.
124. АСС по любому из пп. 115-123 или их комбинации, отличающаяся тем, что каждый из указанных CM1 и CM2 содержит последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 100.
125. АСС по любому из пп. 115-124 или их комбинации, отличающаяся тем, что каждый из указанных CM1 и CM2 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 100.
126. АСС по любому из пп. 115-125 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные DD1 и DD2 представляют собой пару Fc-доменов IgG1 человека или пару Fc-доменов IgG4 человека.
127. АСС по п. 126, отличающаяся тем, что указанные DD1 и DD2 представляют собой пару Fc-доменов IgG1 человека, усеченных на N-конце до цистеина 226, пронумерованных с помощью EU-нумерации, или пару Fc-доменов IgG4 человека, усеченных на N-конце до цистеина 226, пронумерованных с помощью EU-нумерации.
128. АСС по п. 126 или п. 127, отличающаяся тем, что указанные DD1 и DD2 представляют собой пару Fc-доменов IgG4 человека содержат мутацию S228P,

пронумерованную с помощью EU-нумерации.

129. АСС по любому из пп. 115-128 или их комбинации, отличающаяся тем, что каждый из указанных DD1 и DD2 содержит последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 3.
130. АСС по любому из пп. 115-129 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанные DD1 и DD2 содержат последовательность SEQ ID NO: 3.
131. АСС по любому из пп. 115-130 или комбинации, отличающаяся тем, что указанные первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом посредством по меньшей мере двух дисульфидных связей.
132. АСС по любому из пп. 115-131 или комбинации, отличающаяся тем, что указанные первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом посредством по меньшей мере трех дисульфидных связей.
133. АСС по любому из пп. 115-132 или комбинации, отличающаяся тем, что указанные первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом посредством по меньшей мере четырех дисульфидных связей.
134. АСС по любому из пп. 115-133 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанная первая мономерная конструкция дополнительно содержит сигнальную последовательность, непосредственно примыкающую к N-концу CM1.
135. АСС по п. 134, отличающаяся тем, что указанная сигнальная последовательность содержит последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 345.
136. АСС по п. 134, отличающаяся тем, что указанная сигнальная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 345.
137. АСС по любому из пп. 115-136 или их комбинации, содержащая связывающую

область, содержащую не более 12 аминокислот.

138. АСС по п. 137, отличающаяся тем, что указанная связывающая область содержит от 7 до 12 аминокислот.
139. АСС по п. 137, отличающаяся тем, что указанная связывающая область содержит 7 аминокислот.
140. АСС по любому из пп. 115-139 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанная АСС характеризуется по меньшей мере 500-кратным снижением активности интерферона по сравнению с соответствующим контрольным интерфероном.
141. АСС по любому из пп. 115-140 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный СР1 представляет собой интерферон альфа, а контрольный интерферон представляет собой рекомбинантный интерферон альфа.
142. АСС по любому из пп. 115-140 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный СР1 представляет собой интерферон альфа-2b, а контрольный интерферон представляет собой пегилированный интерферон альфа-2b.
143. АСС по любому из пп. 115-142 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанная активность интерферона представляет собой антипролиферативную активность в клетках лимфомы.
144. АСС по любому из пп. 115-142 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанная активность интерферона представляет собой индукцию продуцирования секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы в восприимчивых к интерферону клетках НЕК293.
145. АСС по любому из пп. 115-144, отличающаяся тем, что указанная АСС дополнительно характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия протеазы, для которой СМ1 функционирует в качестве субстрата, при этом соотношение активности интерферона контрольного интерферона к

продукту расщепления составляет менее приблизительно 2, и при этом контрольный интерферон представляет собой соответствующий рекомбинантный интерферон дикого типа или соответствующий пегилированный интерферон.

146. АСС по п. 145, отличающаяся тем, что EC50 указанного продукта расщепления является примерно такой же, как EC50 соответствующего рекомбинантного интерферона дикого типа.
147. АСС по п. 115, отличающаяся тем, что каждая из указанных первой и второй мономерных конструкций содержит последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 313.
148. АСС по п. 147, отличающаяся тем, что указанная АСС характеризуется по меньшей мере 500-кратным снижением активности интерферона по сравнению с интерфероном альфа-2b дикого типа, и при этом АСС дополнительно характеризуется образованием продукта расщепления после воздействия иРА, при этом продукт расщепления имеет примерно такую же активность интерферона, что и интерферон альфа-2b дикого типа, при этом активность интерферона измеряют в антипролиферативном анализе в клетках лимфомы или в анализе индукции продуцирования секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы в восприимчивых к интерферону клетках НЕК293.
149. АСС по п. 147, отличающаяся тем, что указанная АСС проявляет более низкую токсичность *in vivo* по сравнению либо с интерфероном альфа-2b дикого типа, либо с пегилированным интерфероном альфа-2b.
150. Активируемая цитокиновая конструкция (АСС), содержащая первую мономерную конструкцию и вторую мономерную конструкцию, при этом:
 - (a) первая мономерная конструкция содержит первый зрелый цитокиновый белок (CP1); расщепляемый фрагмент (CM1) и первый домен димеризации (DD1);
 - (b) вторая мономерная конструкция содержит второй зрелый цитокиновый белок (CP2), второй расщепляемый фрагмент (CM2) и второй домен димеризации (DD2);

(с) первая мономерная конструкция представляет собой полипептид, содержащий в направлении от N- к С-концу CP1, CM1 и DD1, дополнительно при этом:

- (i) CP1 и CM1 непосредственно примыкают друг к другу,
- (ii) CM1 и DD1 непосредственно примыкают друг к другу,
- (iii) CP1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 85% идентична SEQ ID NO: 1,

(iv) CM1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 85% идентична SEQ ID: 100,

(d) дополнительно при этом:

(i) вторая мономерная конструкция является такой же, как и первая мономерная конструкция,

(ii) первая и вторая мономерные конструкции ковалентно связаны друг с другом посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи, и

(iii) DD1 и DD2 представляют собой пару Fc-доменов IgG4 человека;

(e) DD1 и DD2 связываются друг с другом, за счет чего образуется димер первой мономерной конструкции и второй мономерной конструкции; и

(f) АСС характеризуется сниженным уровнем активности интерферона альфа по сравнению с активностью интерферона альфа пегилированного интерферона альфа-2b.

151. Композиция, содержащая АСС по любому из пп. 115-150 или их комбинации.

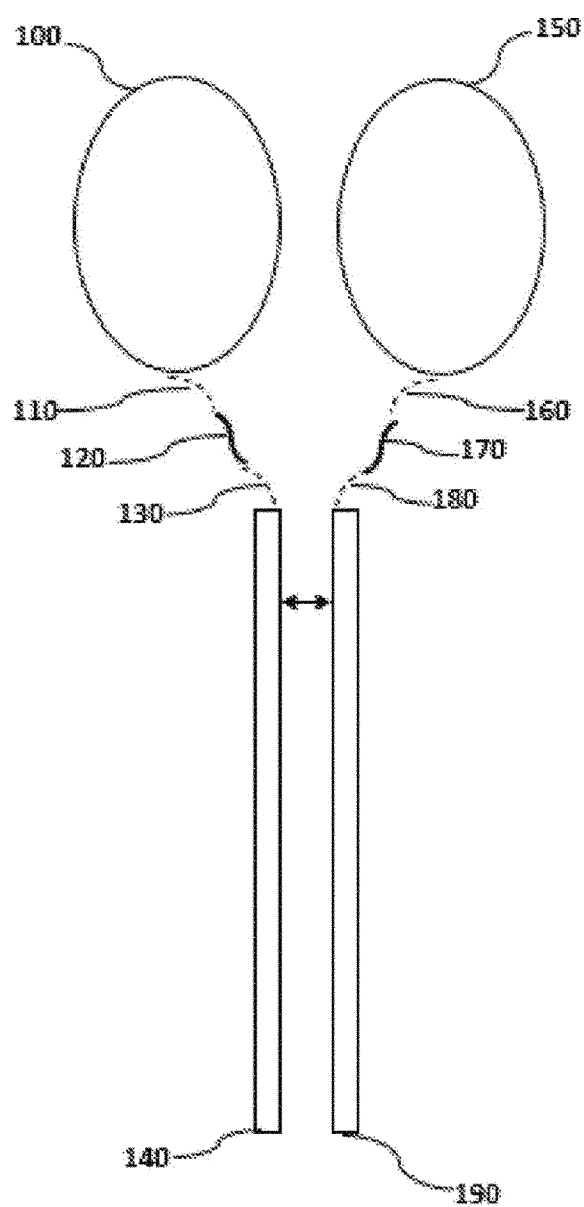
152. Композиция по п. 151, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

153. Контейнер, флакон, шприц, шприц-ручка или набор, содержащие по меньшей мере одну дозу композиции по п. 151 или п. 152.

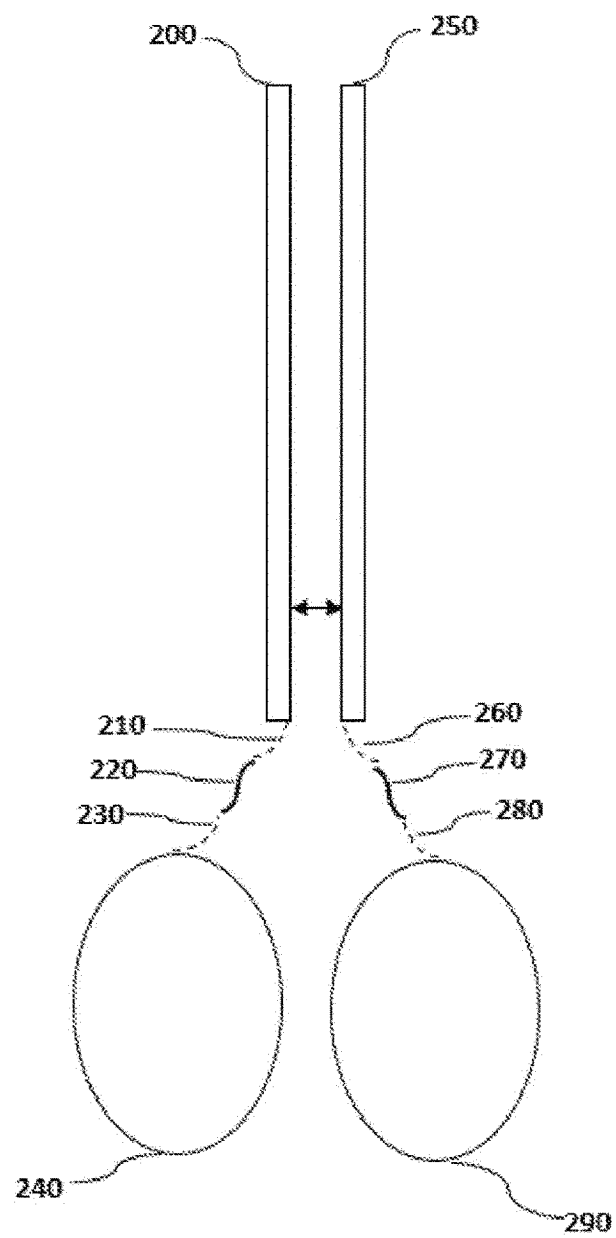
154. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества АСС по любому из пп. 115-150 или композиции по п. 151 или п. 152.

155. Способ по п. 154, отличающийся тем, что субъект был идентифицирован или диагностирован как имеющий рак.

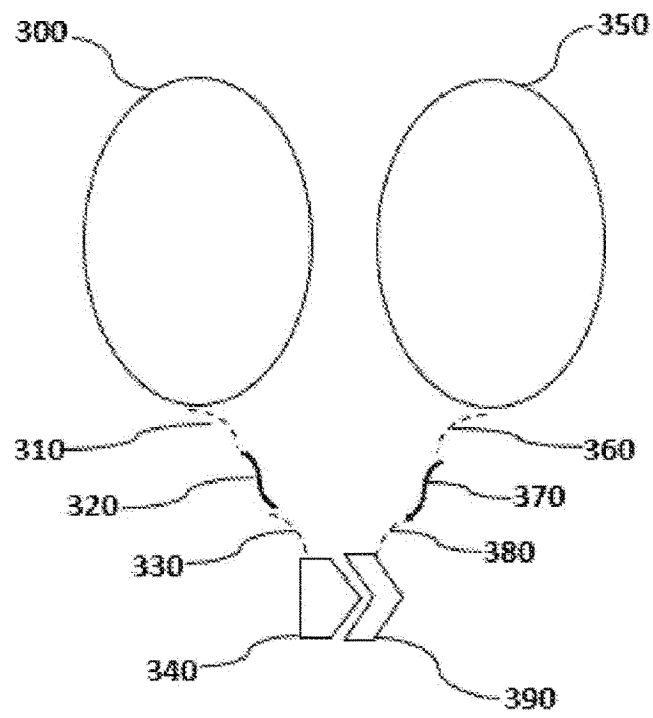
156. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который содержит первый мономер АСС по любому из пп. 115-150 или их комбинации.
157. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 156.
158. Вектор по п. 157, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой вектор экспрессии.
159. Клетка млекопитающего, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 156, или вектор по п. 157 или п. 158.
160. Клетка млекопитающего по п. 159, отличающаяся тем, что указанная клетка млекопитающего представляет собой клетку НЕК293 или клетку СНО.
161. Способ получения АСС, при этом способ включает:
 - a. экспрессию АСС в клетке млекопитающего по п. 159 или 160; и
 - b. очистку экспрессируемой АСС.
162. АСС по любому из пп. 115-150 или их комбинации, отличающаяся тем, что указанный СМ1 функционирует в качестве субстрата для протеазы, которая сверхэкспрессируется в опухолевой ткани.



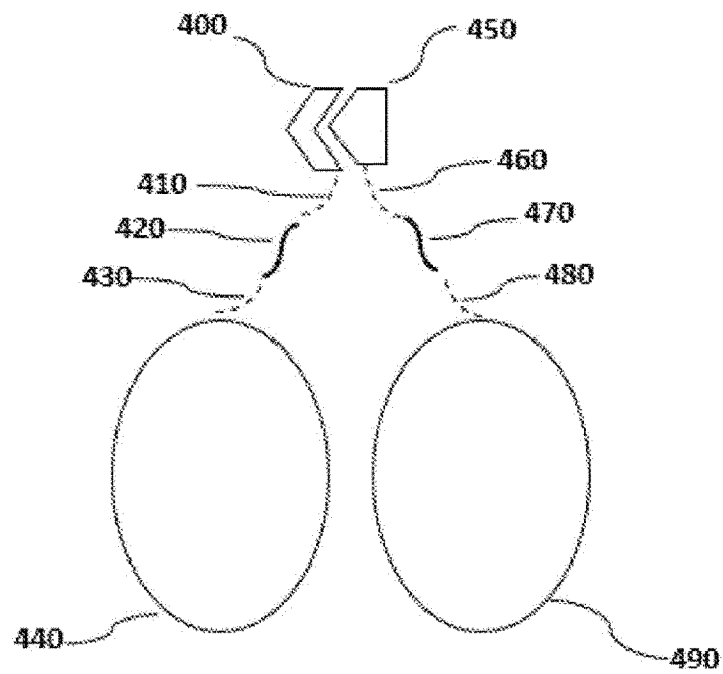
Фиг. 1А



Фиг. 1В



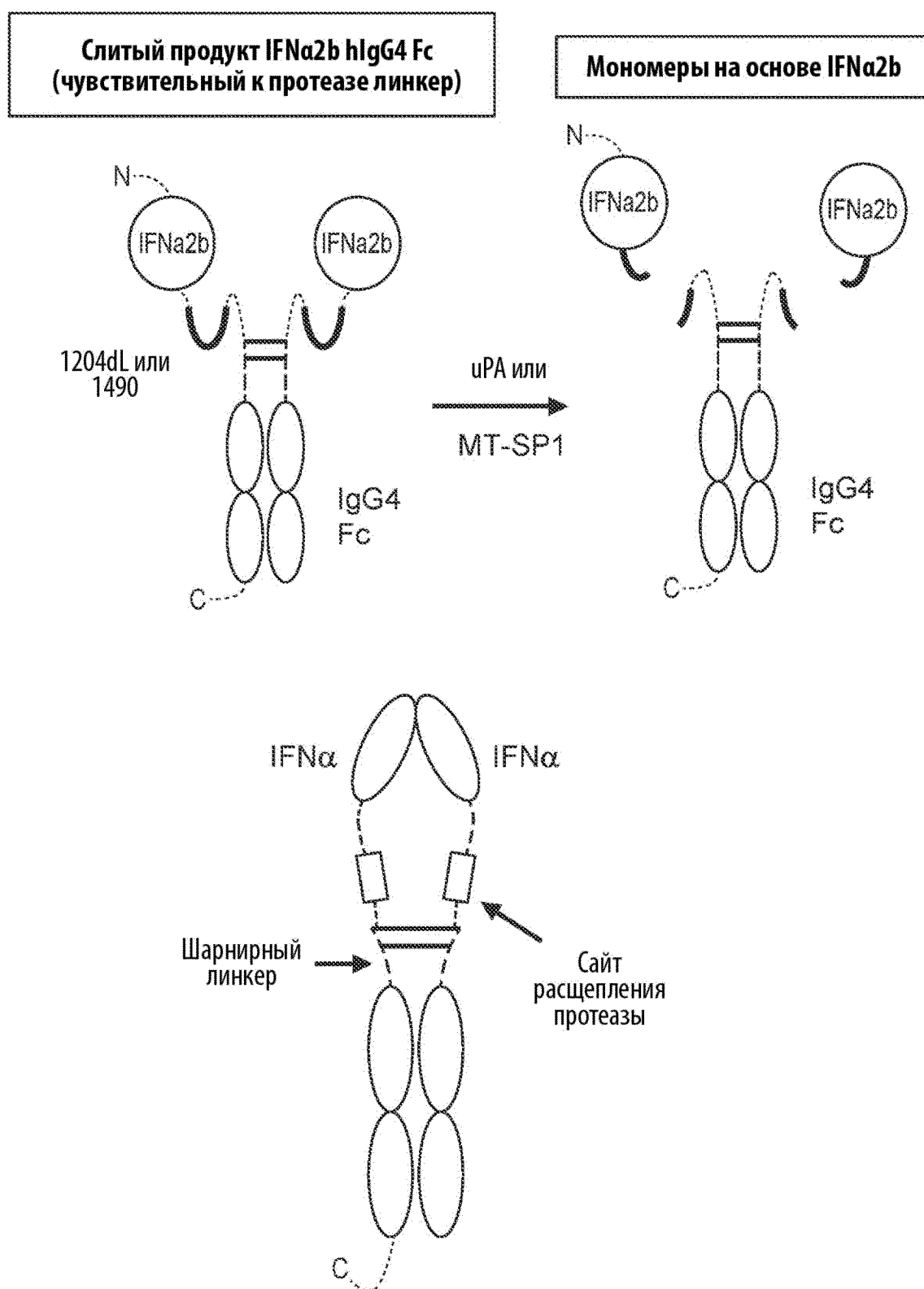
Фиг. 2А



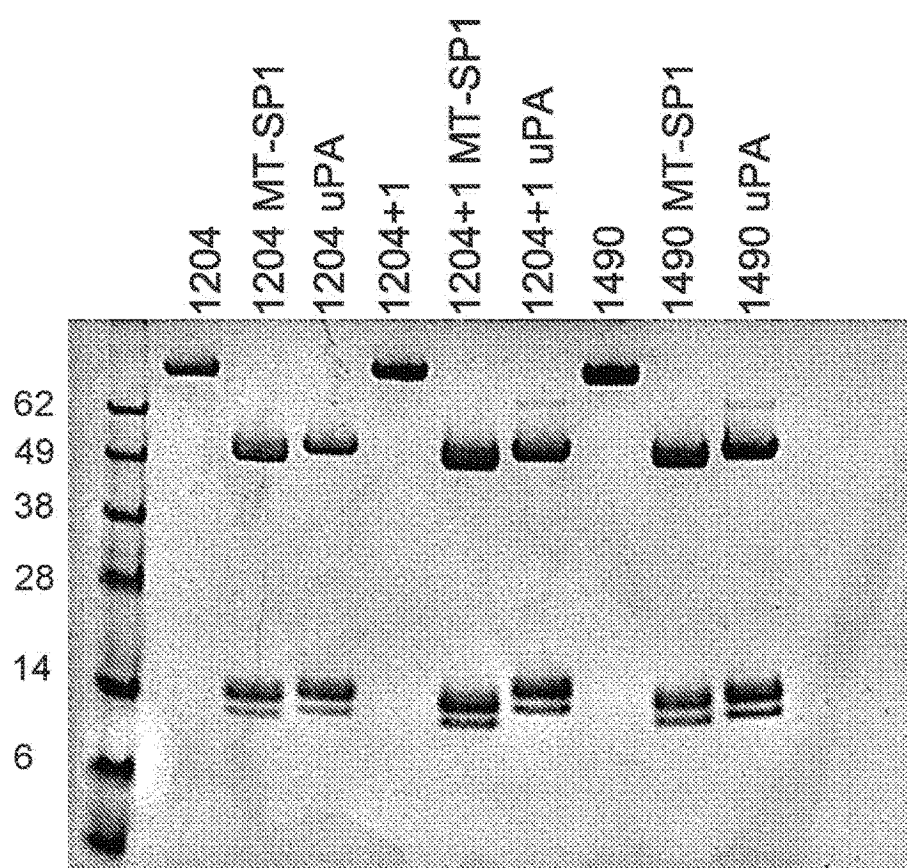
Фиг. 2В

METDTLLLWVLLLWVPGSTGCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFS
CLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAW
DETLLDKFYTELYQQQLNDLEACV IQGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQ
RITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE**SGRSDNI**
GGGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
(SEQ ID NO:309)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFS
CLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAW
DETLLDKFYTELYQQLNDEACVIOGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQ
RITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLS
GRSDNI GGGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLF
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
(SEQ ID NO:311)



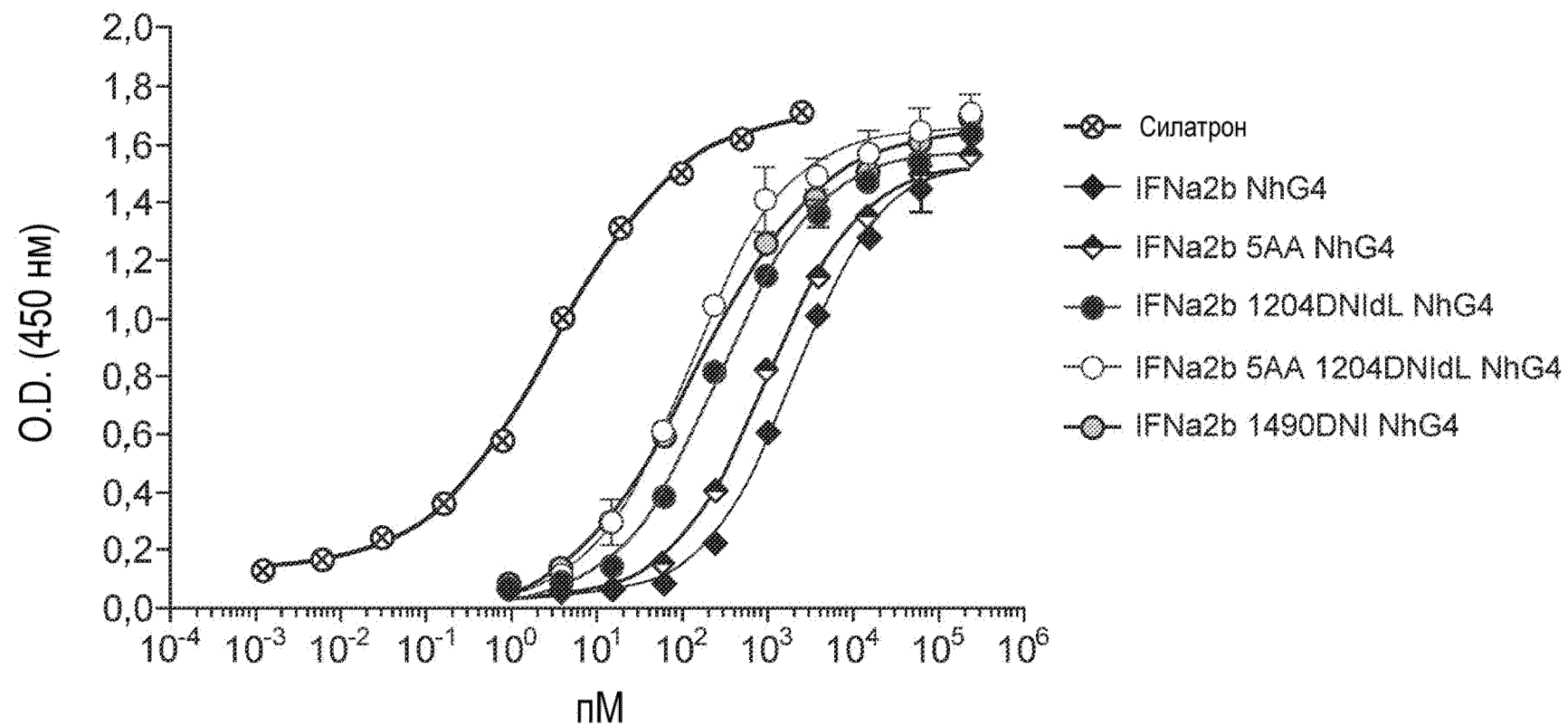
Фиг. 5



+1 обозначает конструкции с 5AA, добавленными в линкеры

Фиг. 6

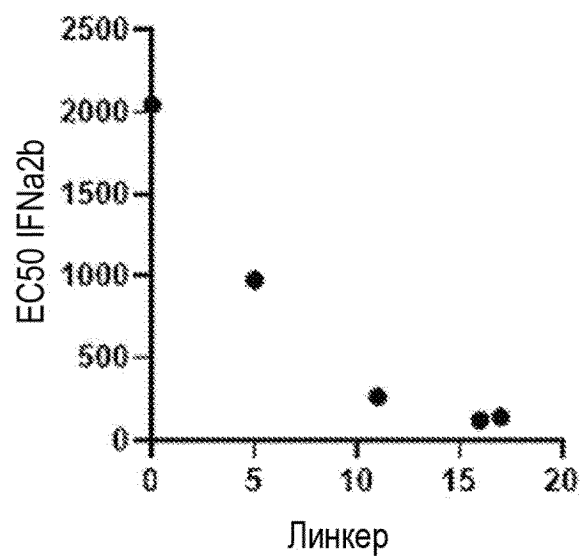
Репортер НЕК293: маскированные слитые продукты IFNa2b Fc
111419HA



Фиг. 7

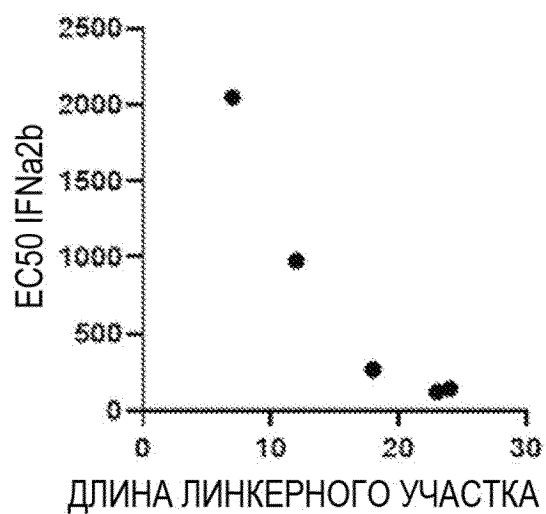
EC50: маскированные продукты на
основе N-концевого hlgG4, слитого с
IFNa2b

111419HA

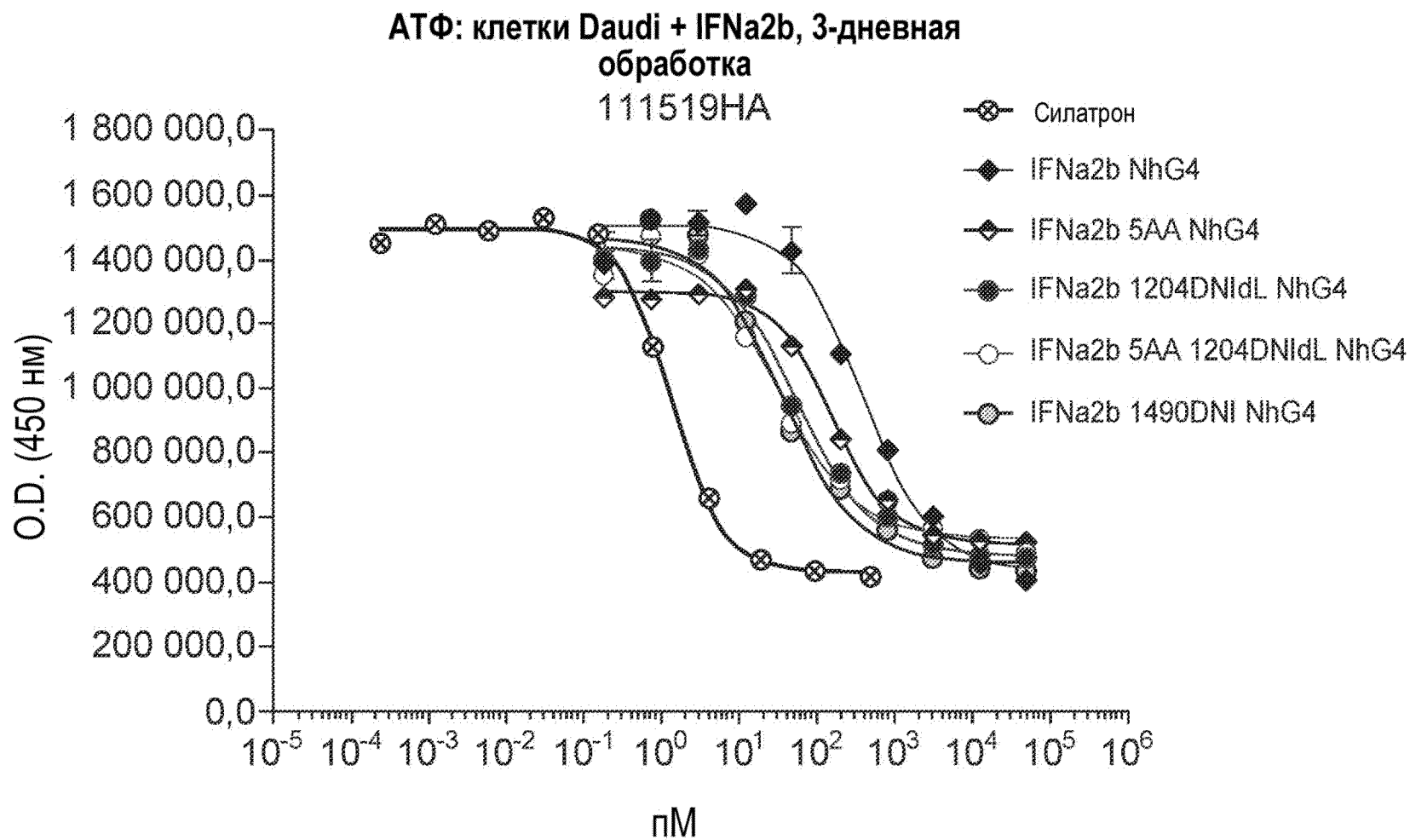


Фиг. 8А

EC50: маскированные продукты на
основе N-концевого hlgG4, слитого с
IFNa2b

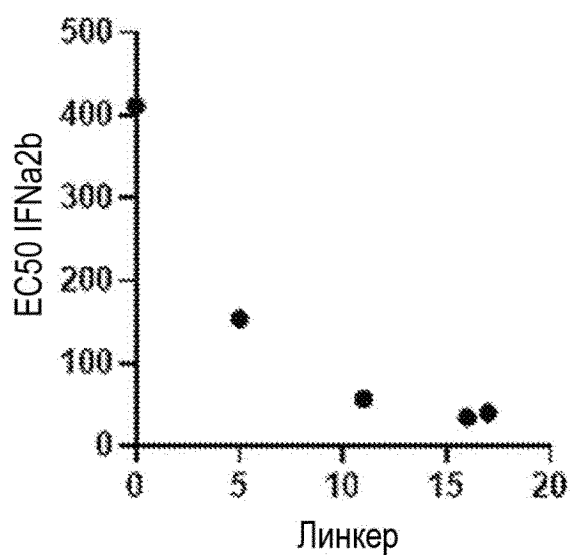


Фиг. 8В



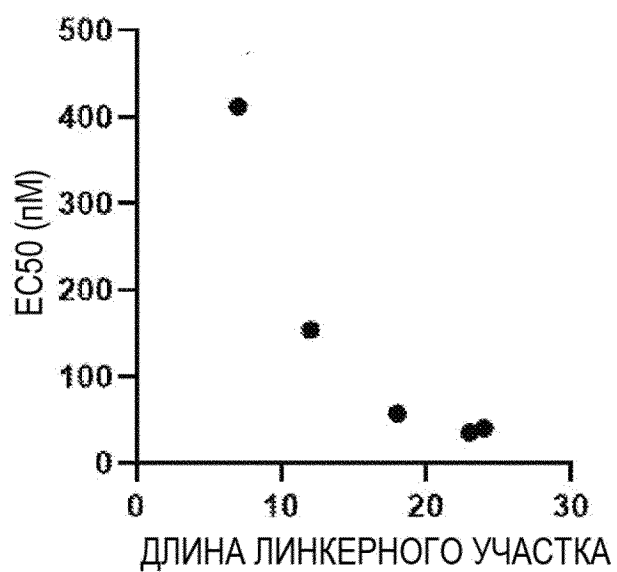
Фиг. 9

EC50: маскированные продукты на
основе N-концевого hlgG4, слитого с
IFNa2b
111419HA

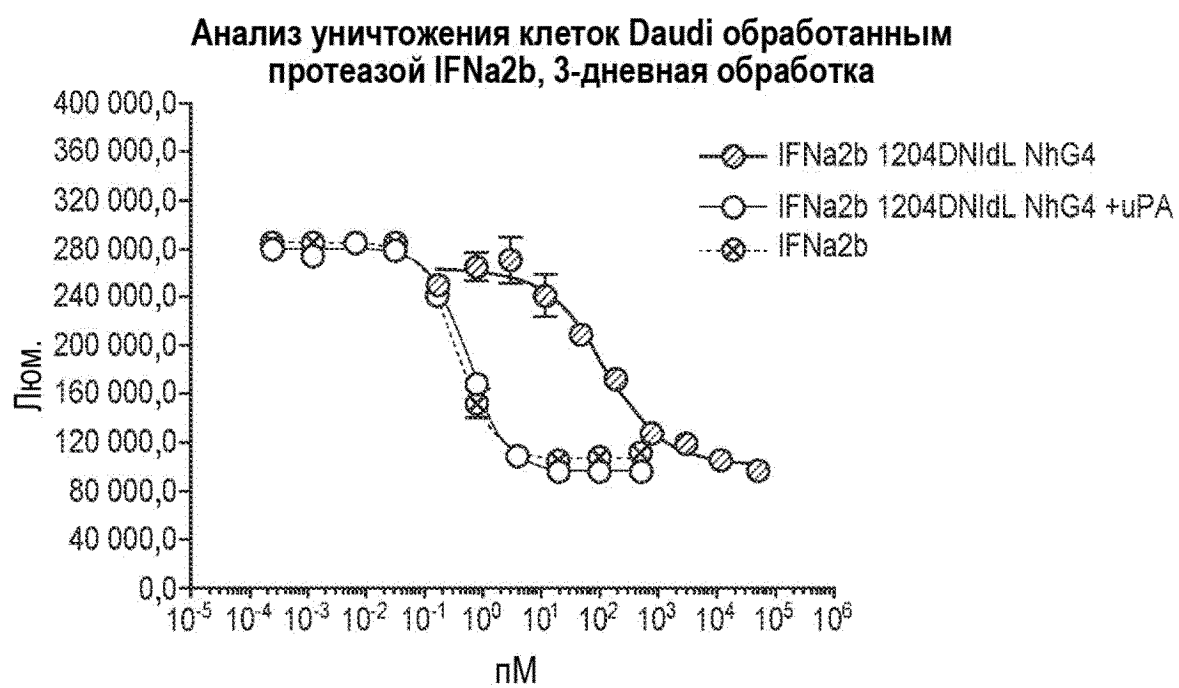


Фиг. 10А

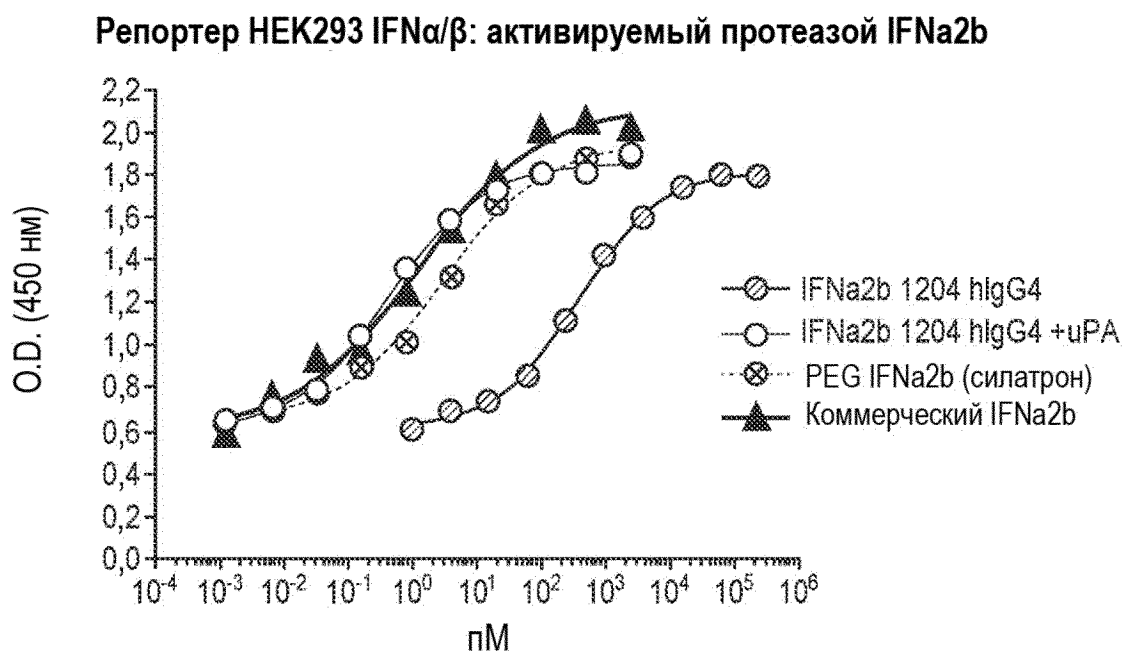
Цитотоксическая EC50 в отношении
клеток Daudi: слитые конструкции IFNa2b
hlgG4
111419HA



Фиг. 10В

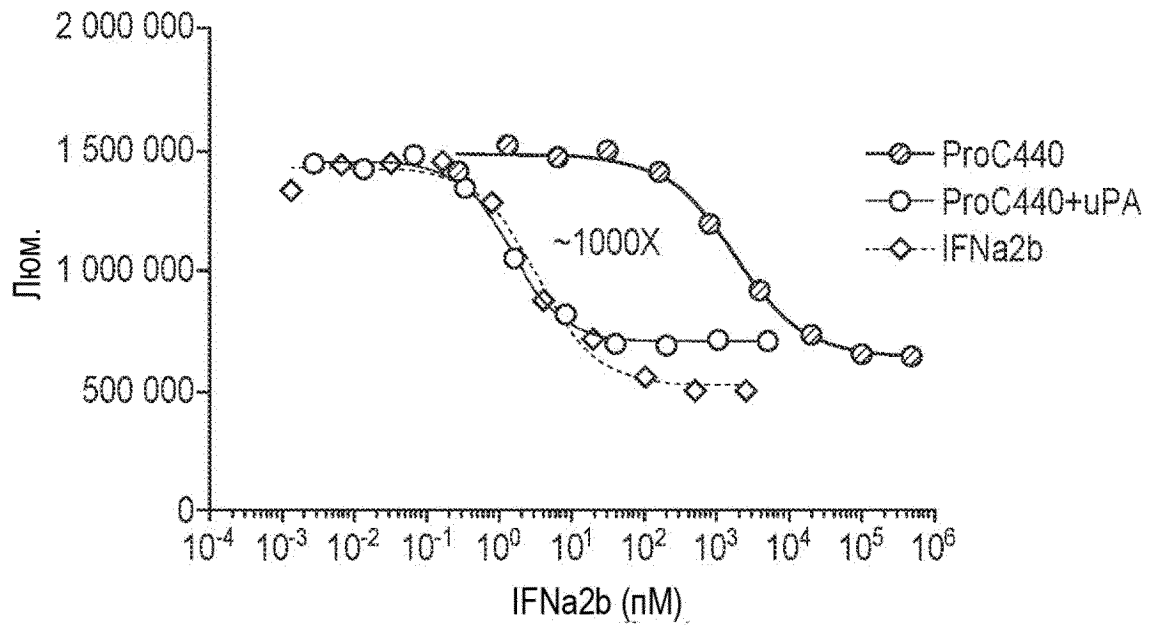


Фиг. 11

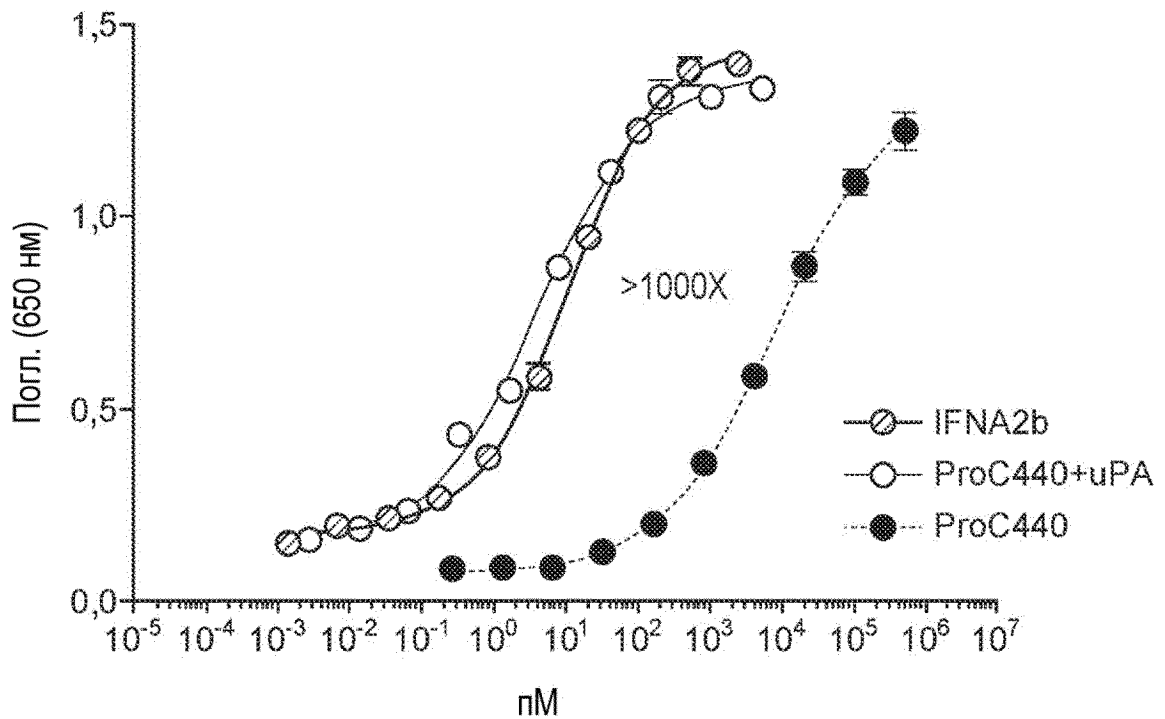


Фиг. 12

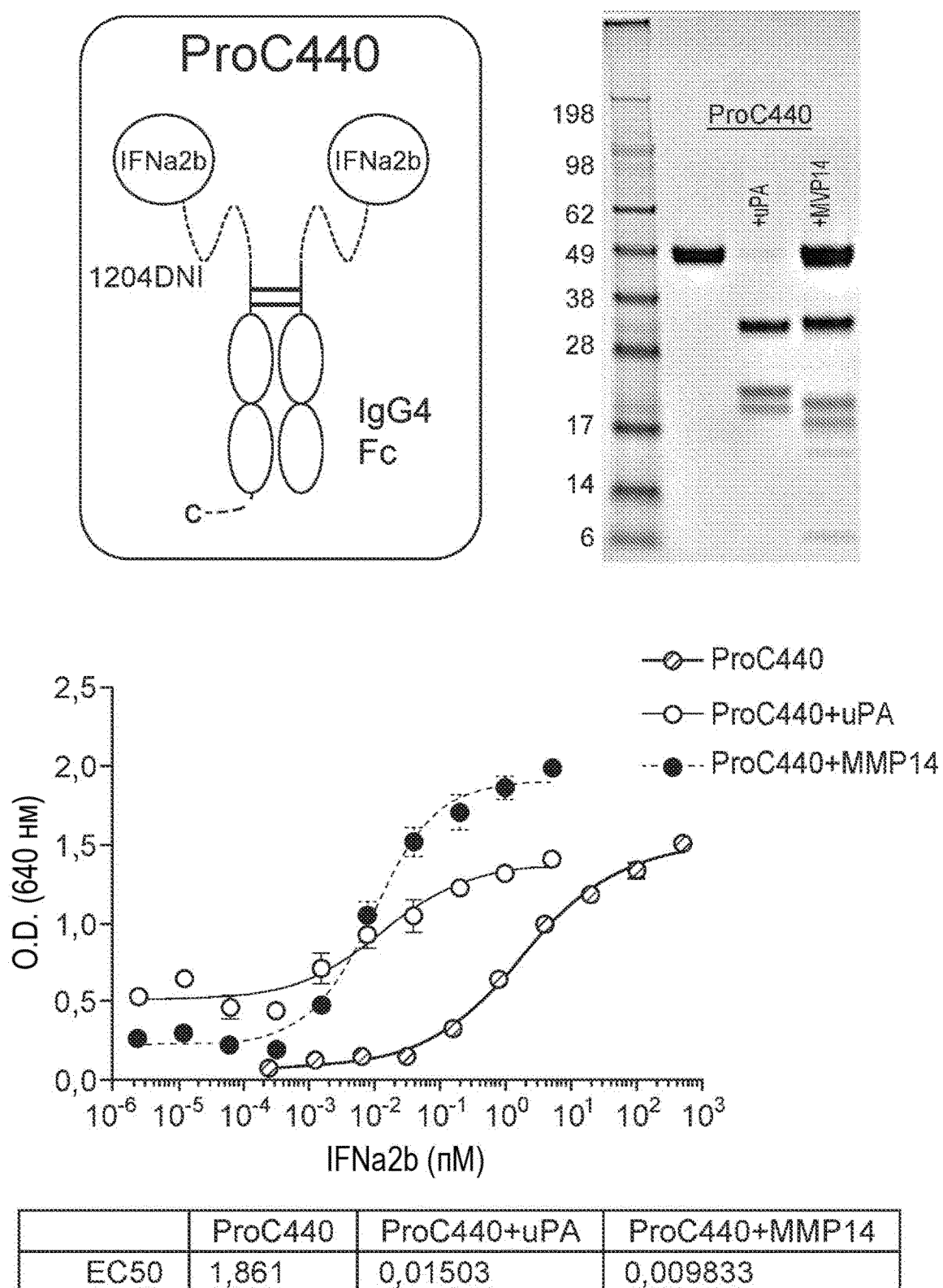
Анализ на основе клеток Daudi



Репортер HEK IFNa



Фиг. 13



Фиг. 14А

Данные LC-MS ProC440:

Расщепление MMP14

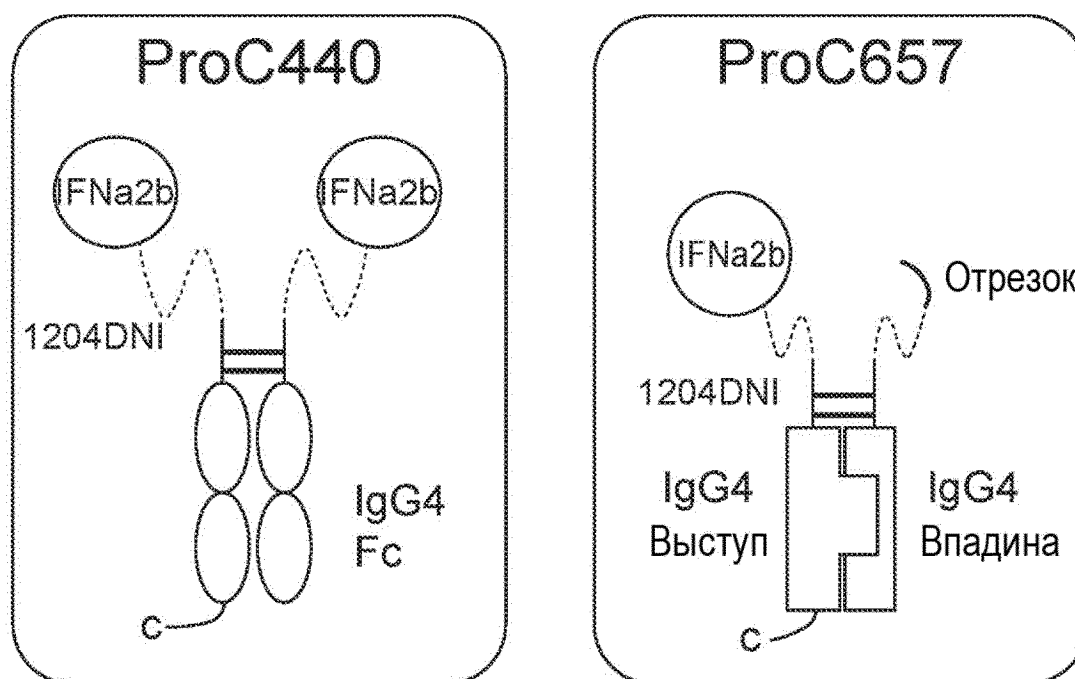
L161

Расщепление uPa: 25145,1 Да

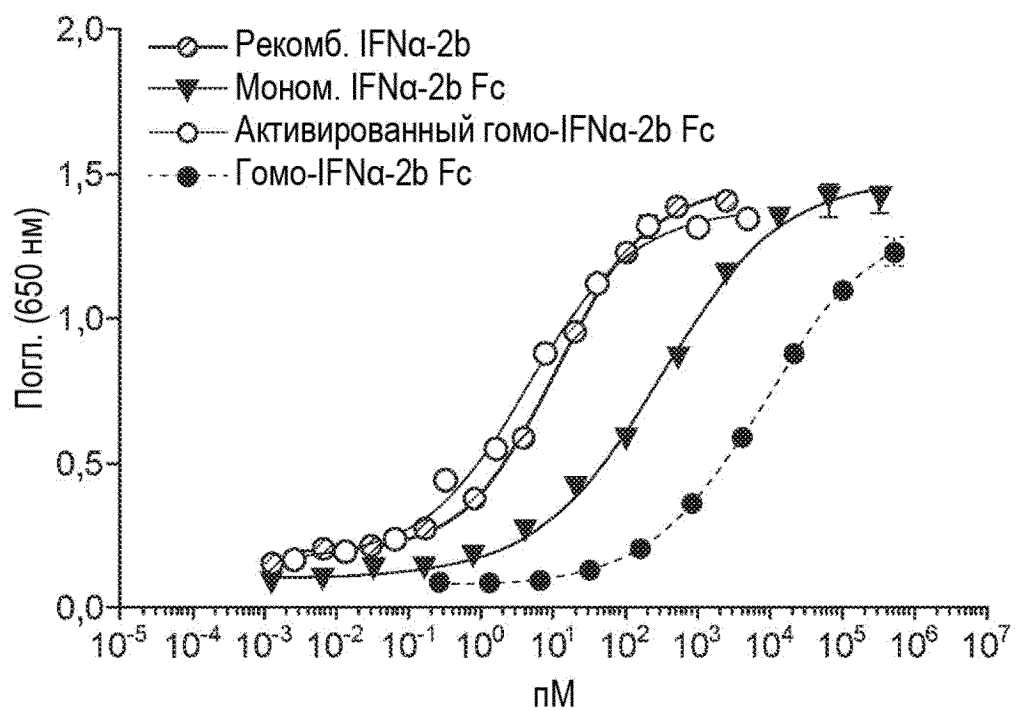
S169

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSA
AWDETLLDKFYTELYQQNLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIM
RSFSLSTNLQESLRSKESGRSDNICPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS

Фиг. 14В

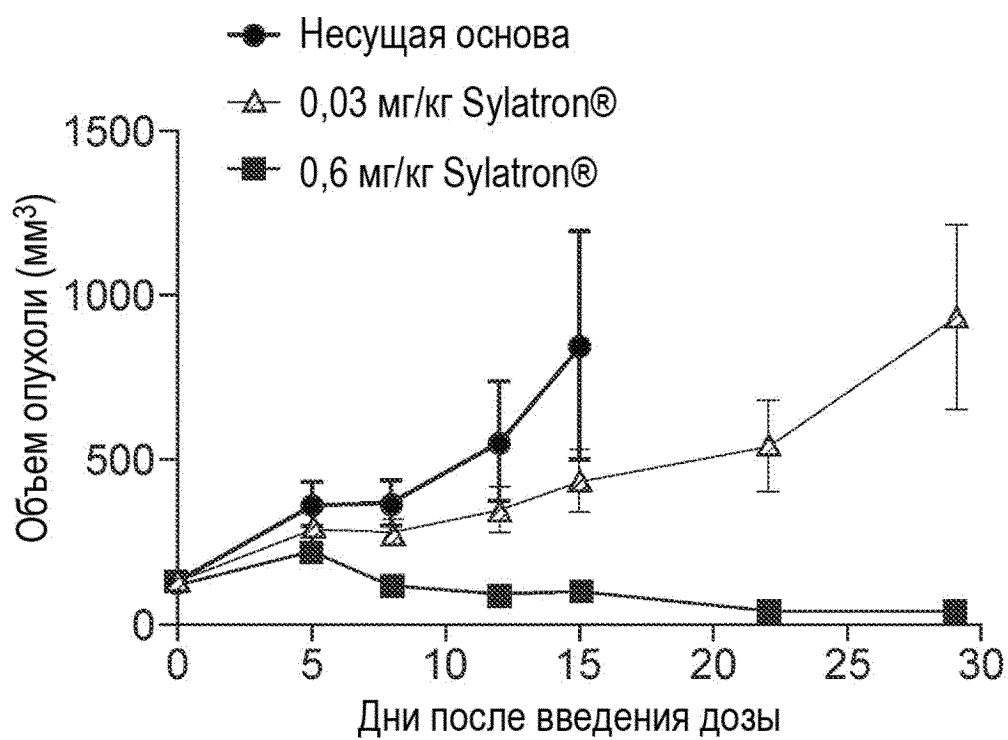
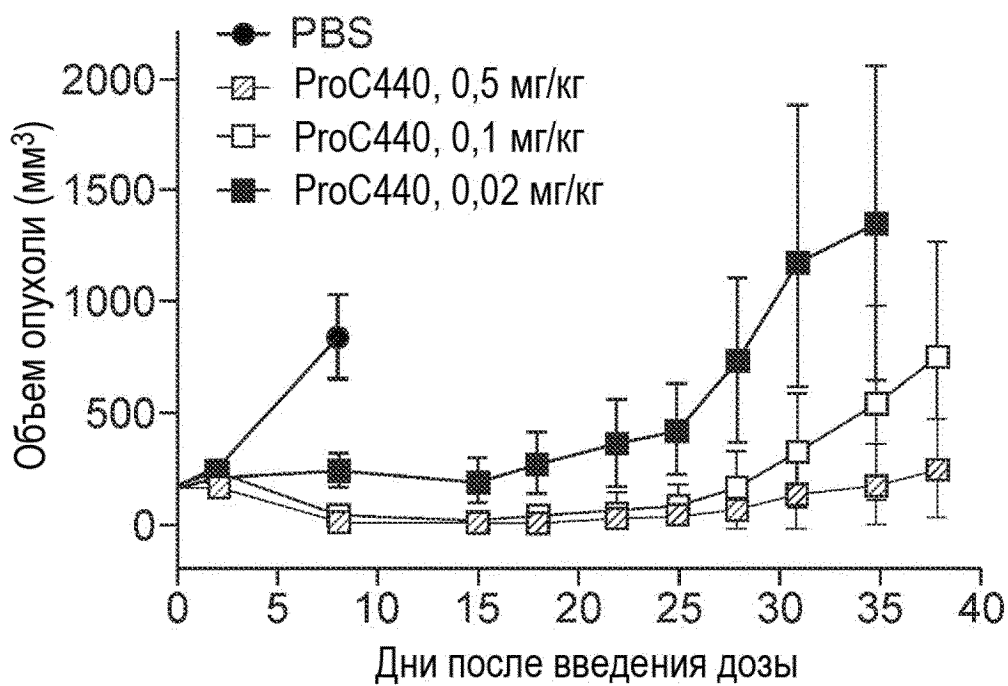


Репортерный анализ НЕК

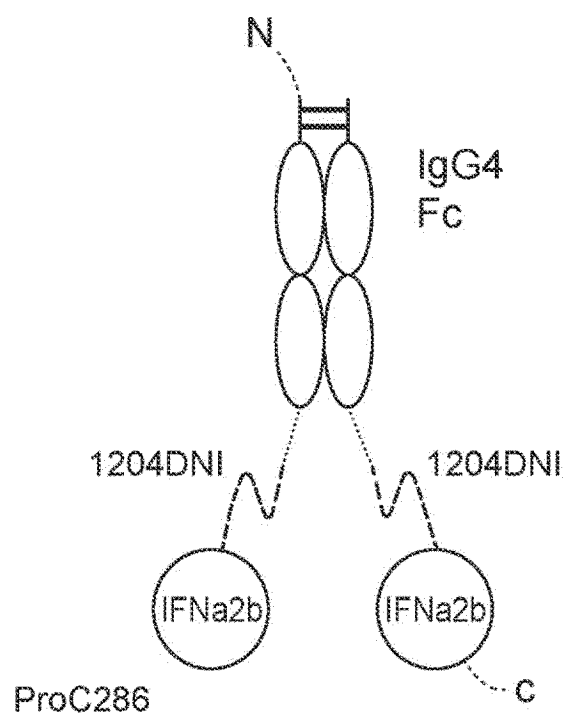


Фиг. 15

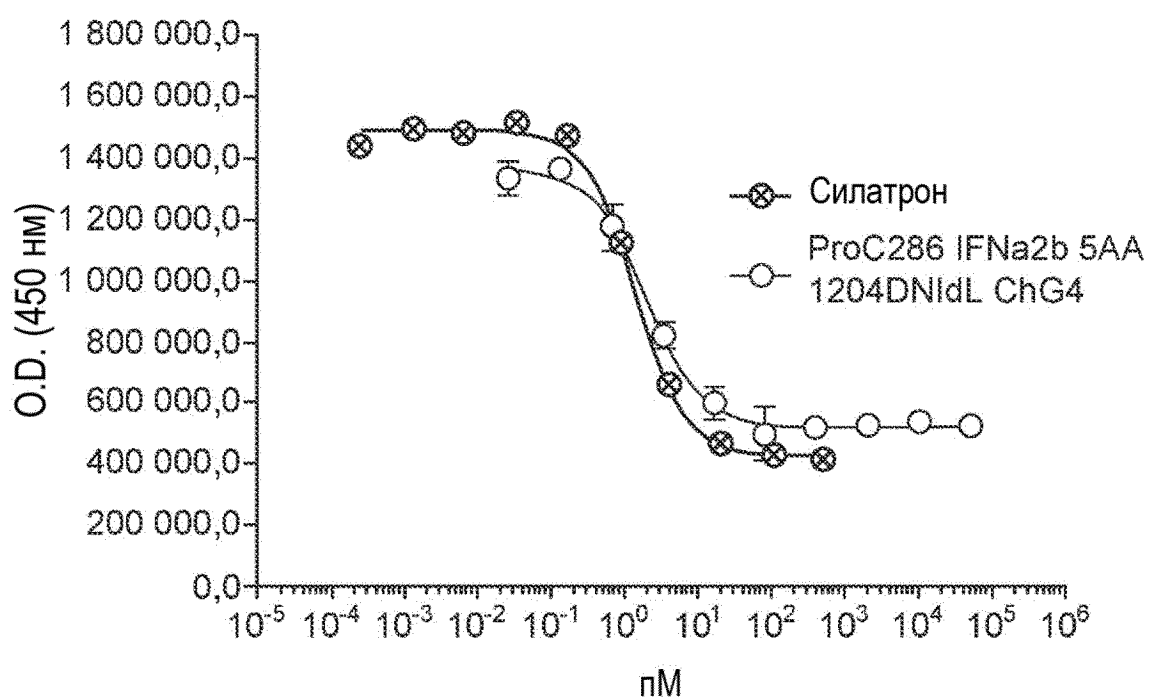
C20-031: рост опухолей из клеток Daudi



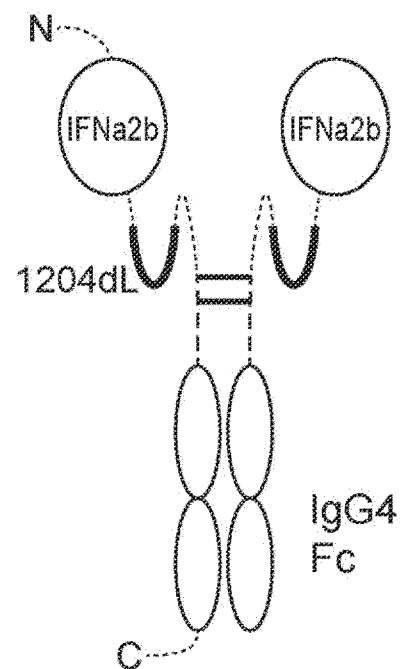
Фиг. 16



**АТФ: клетки Daudi + IFNa2b,
3-дневная обработка**



Фиг. 17А



IFNa2b Fc в N-конц. 1 линкере 1204DN

IFNa2b 5AA 1204dL NhG4

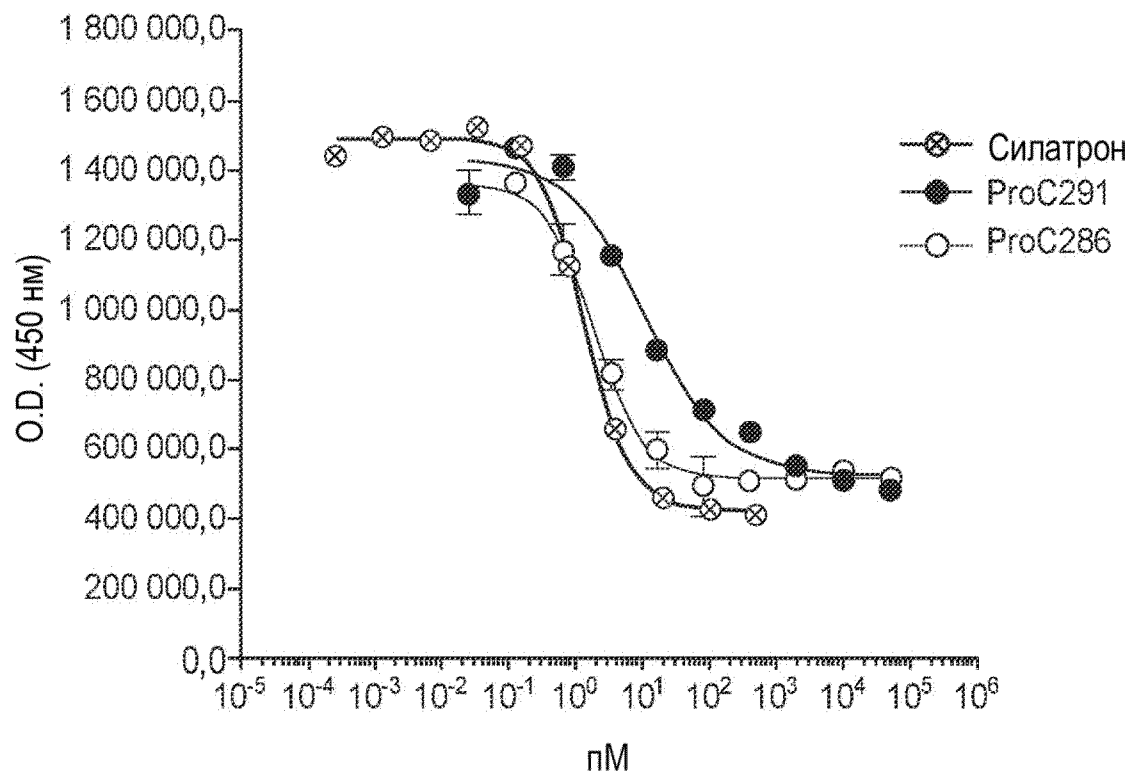
IFNa2b-hlgG4

5AA 1204DNIAL

...RSKESGGGGSGR/SDNIGGGSESKYGPCCPPC..

PROC291

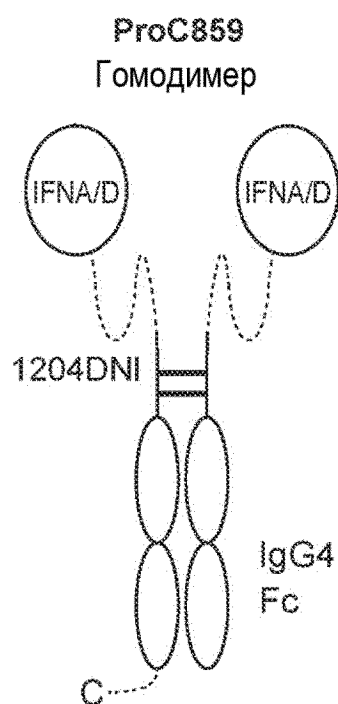
Анализ пролиферации на основе клеток Daudi



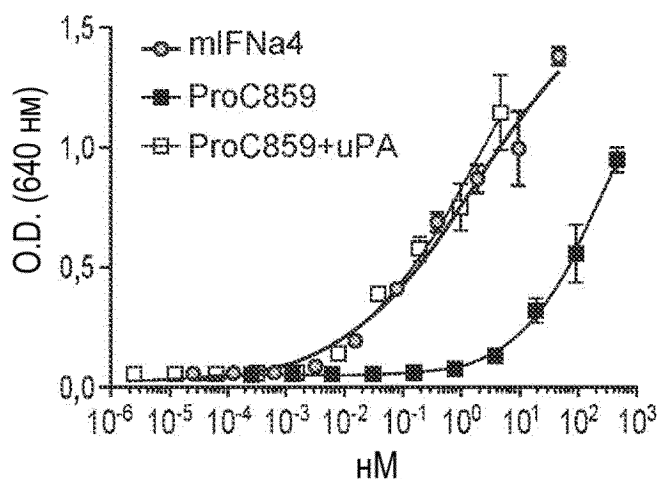
Фиг. 17В

	IFNa-con	ProC440- α IPa	PEG-IFNa2b (силатрон)	ProC440
Специфическая активность	$1-2 \times 10^9$ Ед/мг	$3,5 \times 10^8$ Ед/мг	$0,7 \times 10^8$ Ед/мг	$1,3 \times 10^7$ Ед/мг
Ожидаемая токсическая доза	0,1 мг/кг*	0,288 мг/кг	1,43 мг/кг	7,68 мг/кг

Фиг. 18



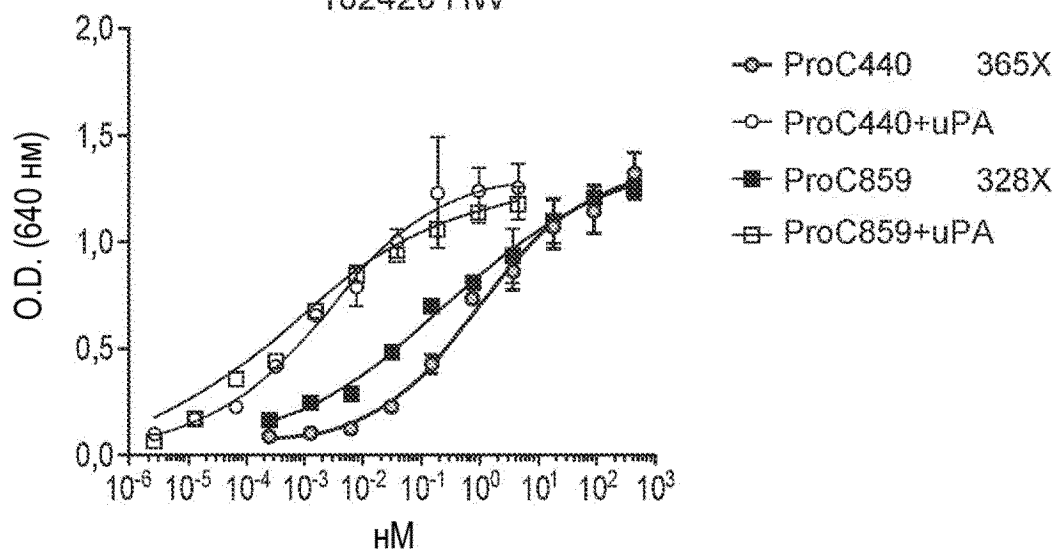
Анализ репортера B16 IFNa



	mIFNa4	ProC859	ProC859+uPA
EC50	1,966	293,7	1,951

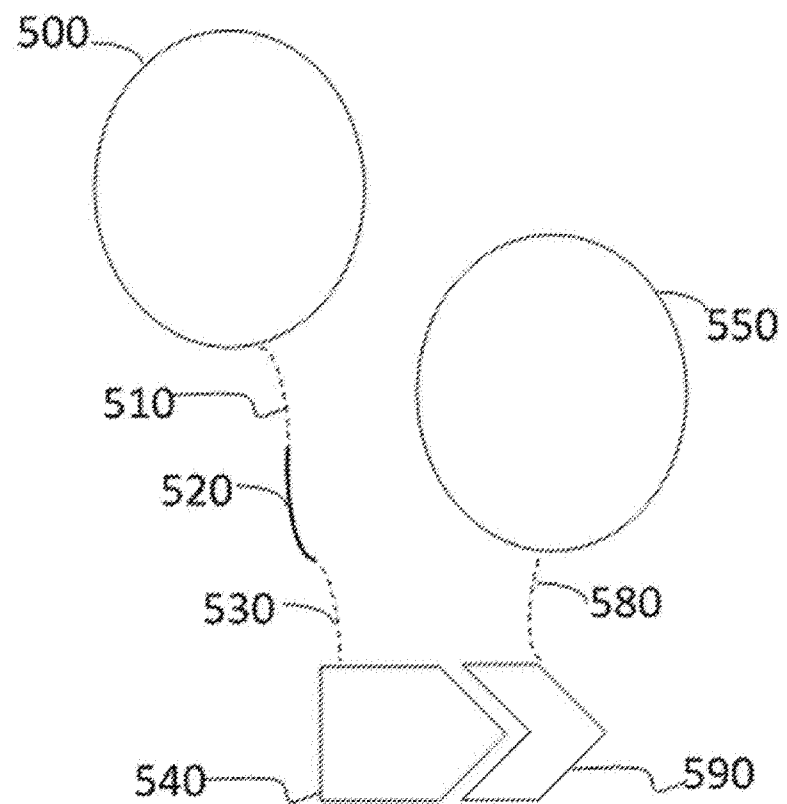
НЕК: IFNa2b по сравнению со слитым продуктом IFNaAD

102420 HW

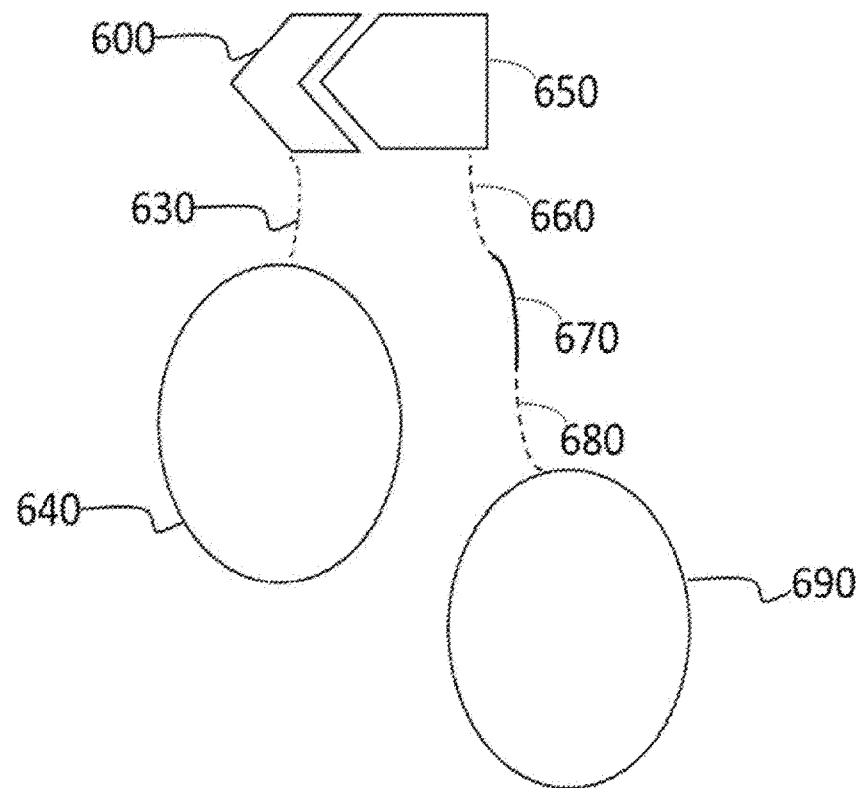


	ProC440	ProC440+uPA	ProC859	ProC859+uPA
EC50	0,9502	0,002580	0,2321	0,0006991

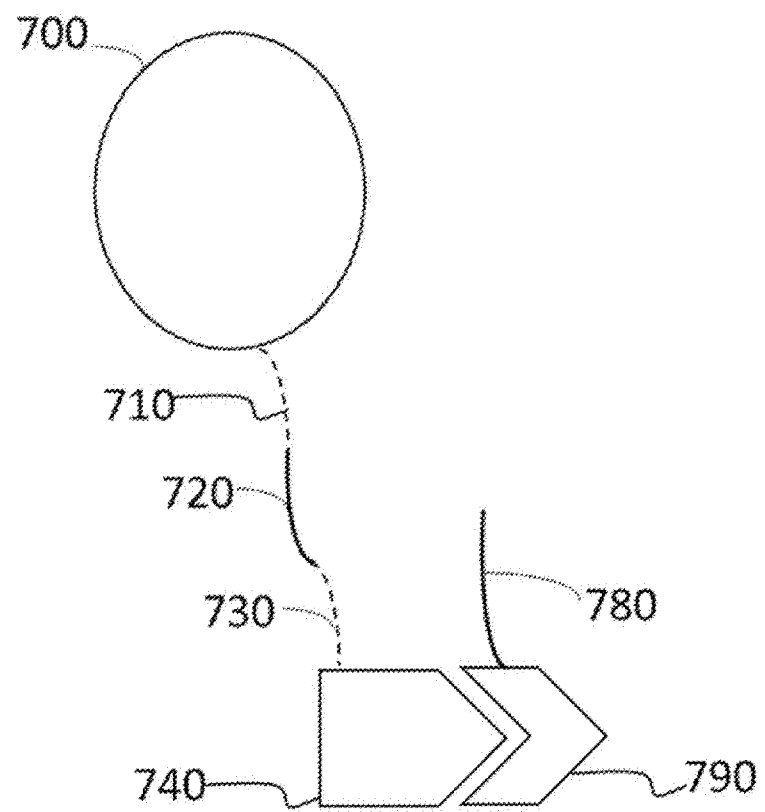
Фиг. 19



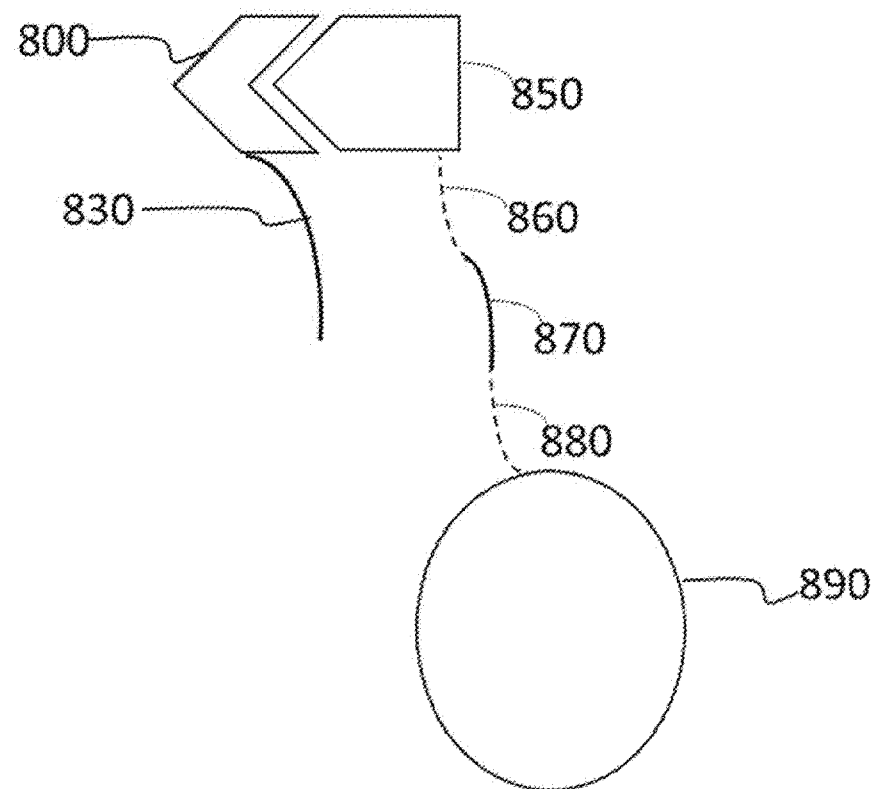
Фиг. 20А



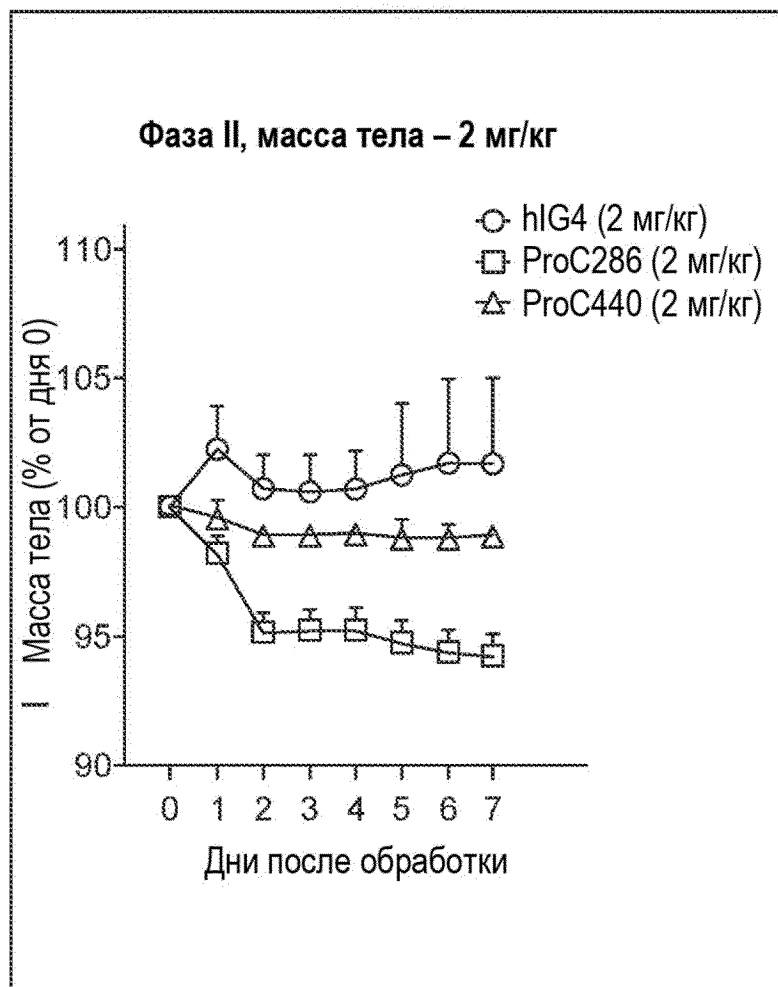
Фиг. 20В



Фиг. 21А



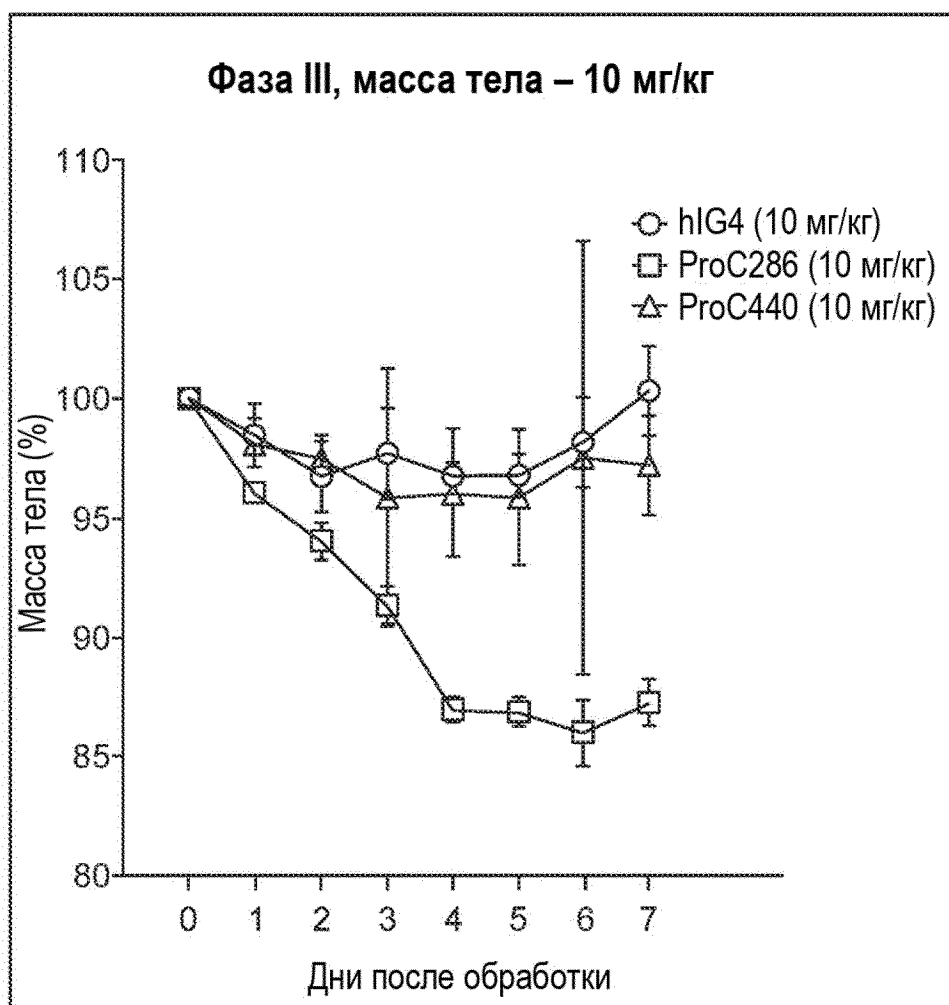
Фиг. 21В

2 мг/кг

- Контроль – hlgG4
- Тестируемый препарат А = ProC286
- △ Тестируемый препарат В = ProC440

Фиг. 22

10 мг/кг



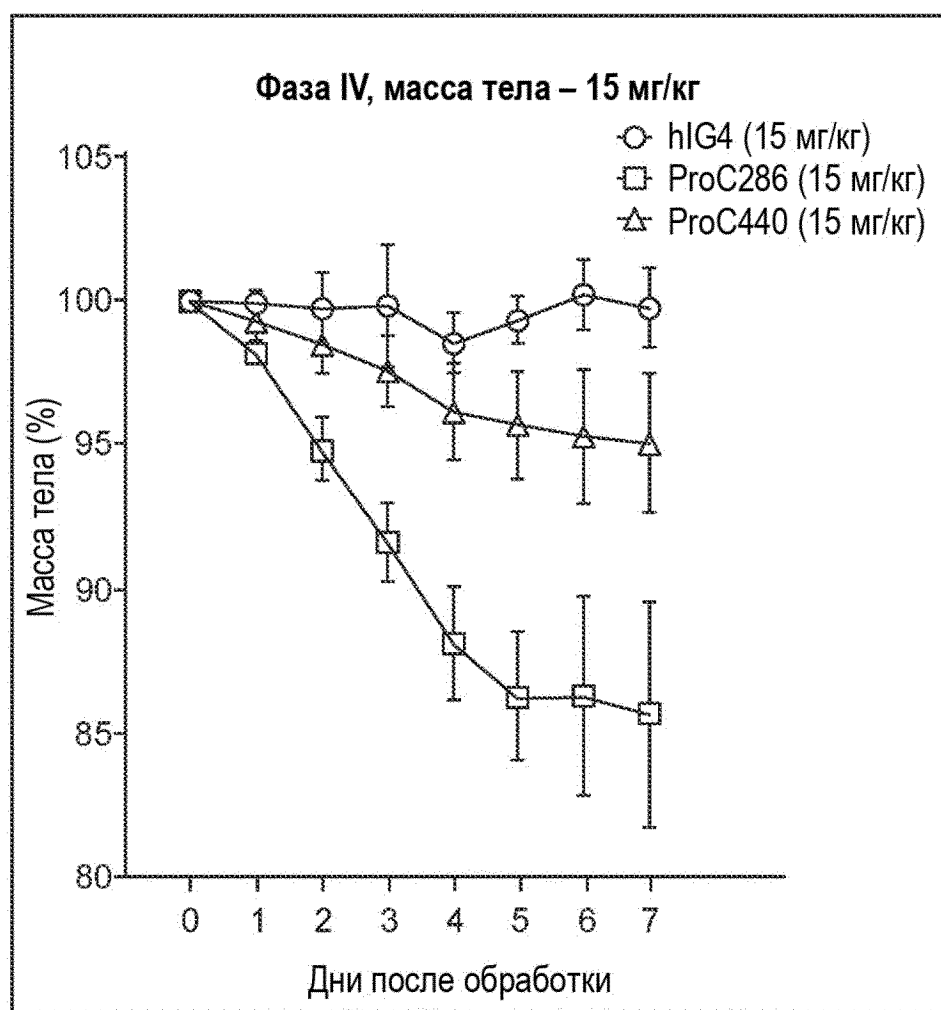
○ Контроль – hlgG4

□ Тестируемый препарат А = ProC286

△ Тестируемый препарат В = ProC440

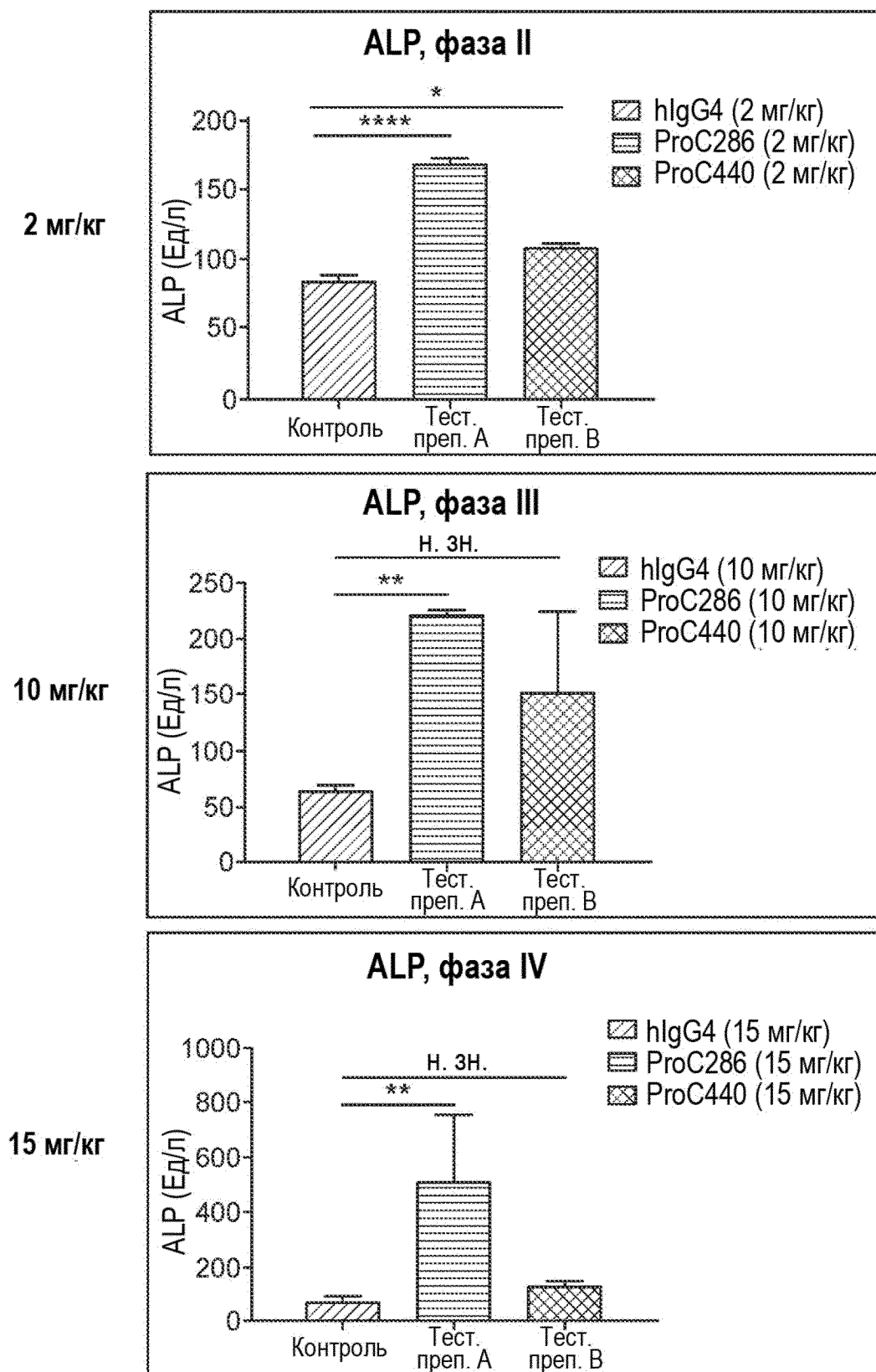
Фиг. 22 (Продолжение)

15 мг/кг

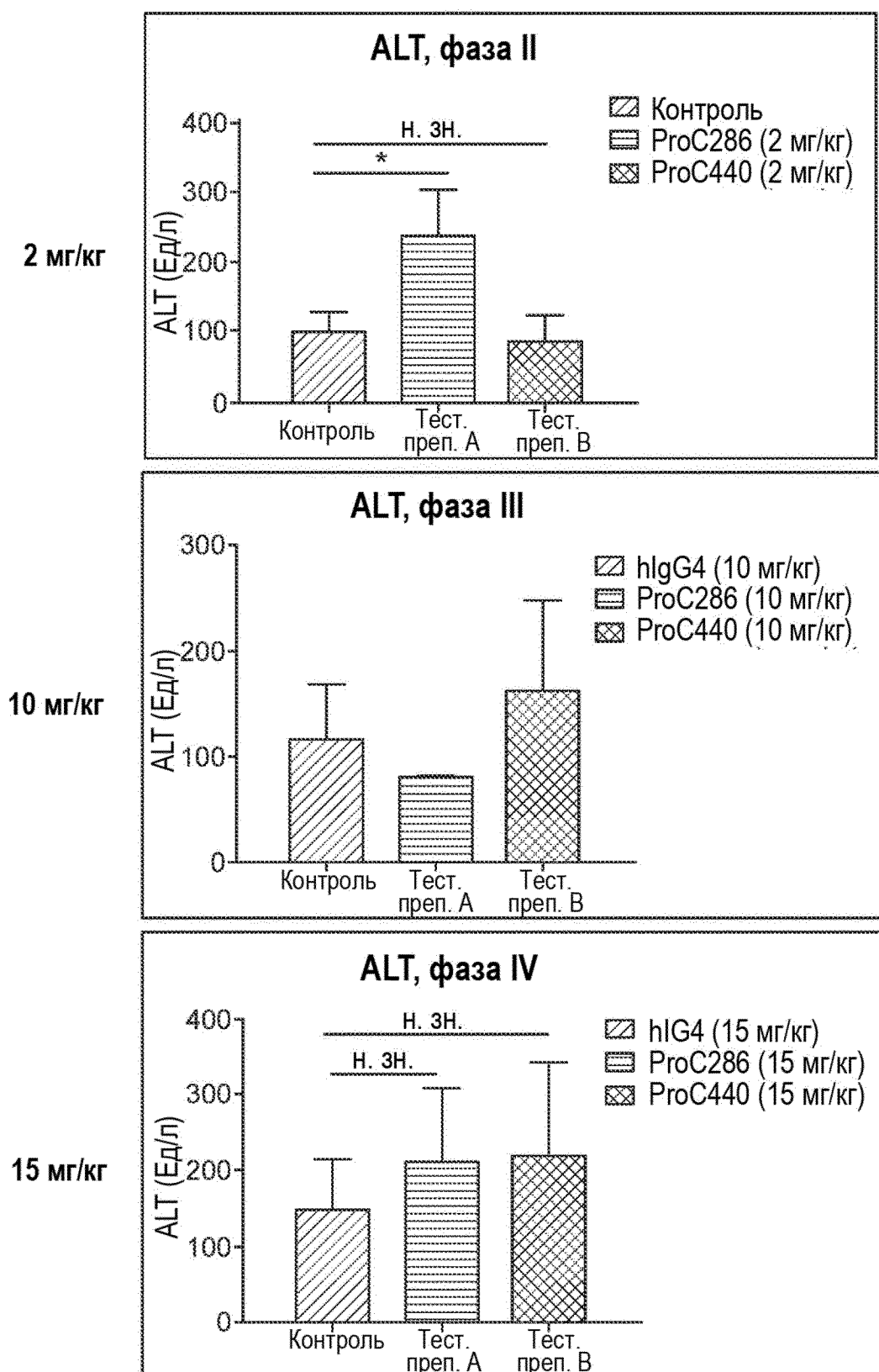


- Контроль – hlgG4
- Тестируемый препарат А = ProC286
- △ Тестируемый препарат В = ProC440

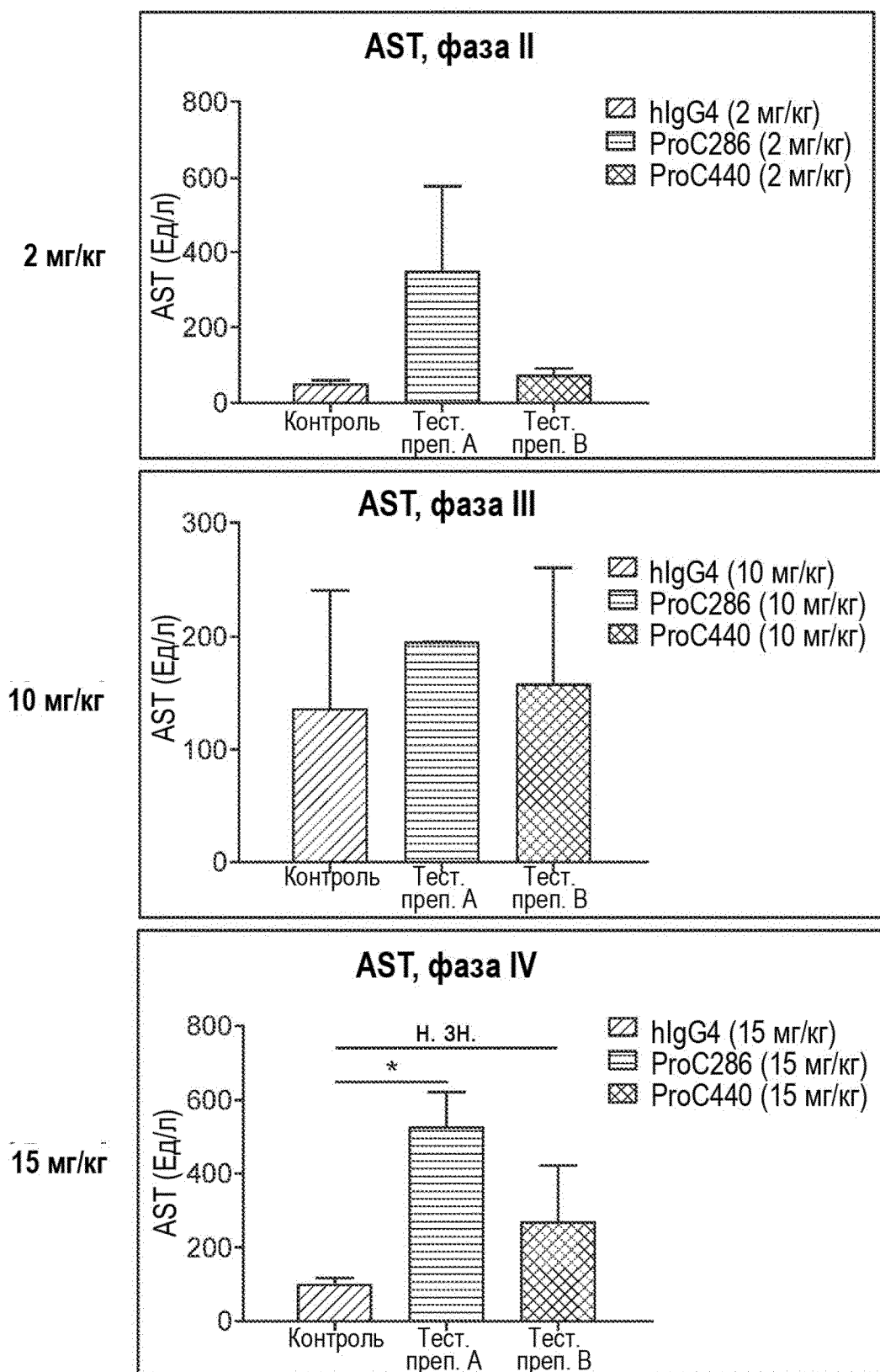
Фиг. 22 (Продолжение)



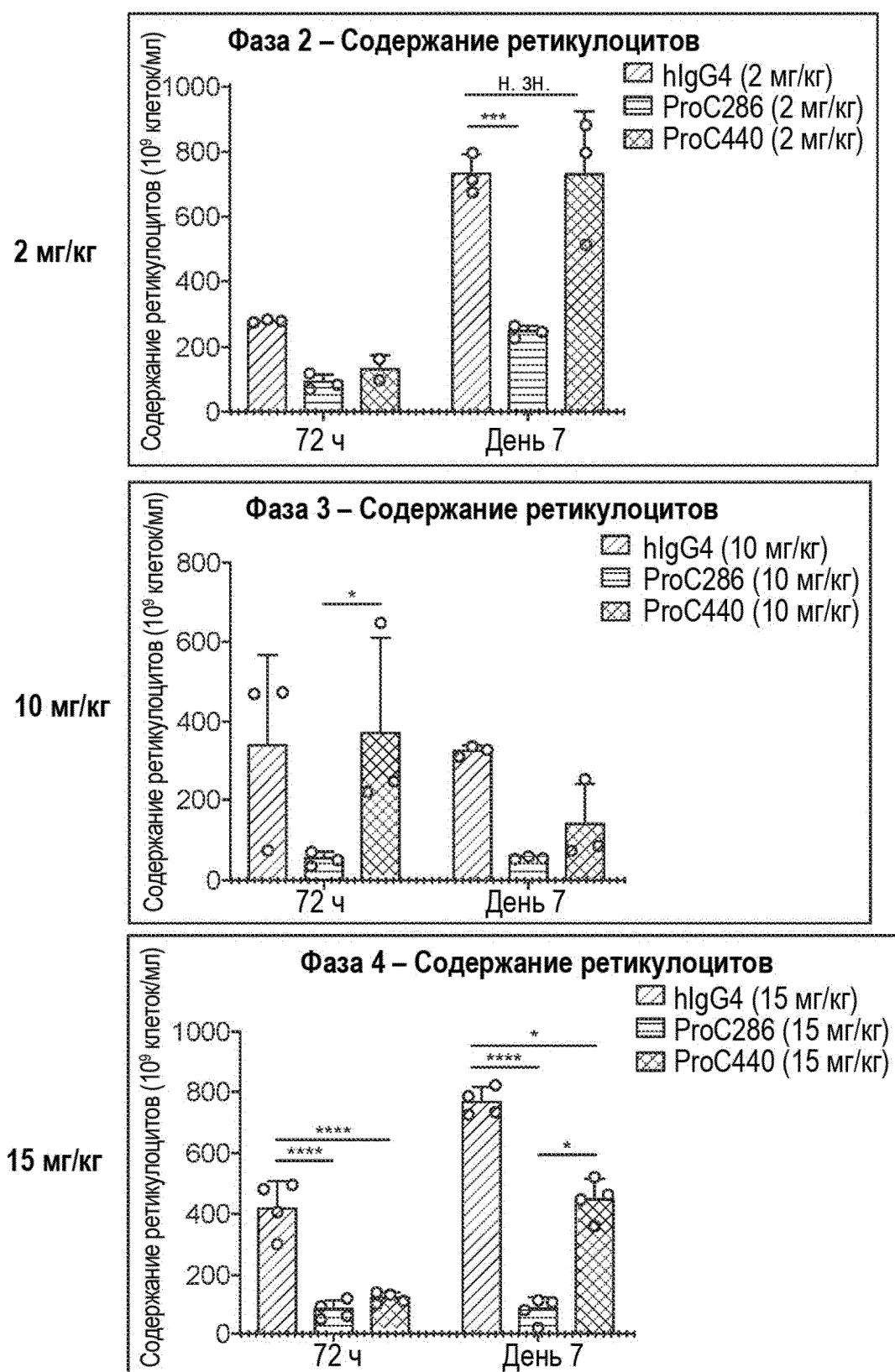
Фиг. 23



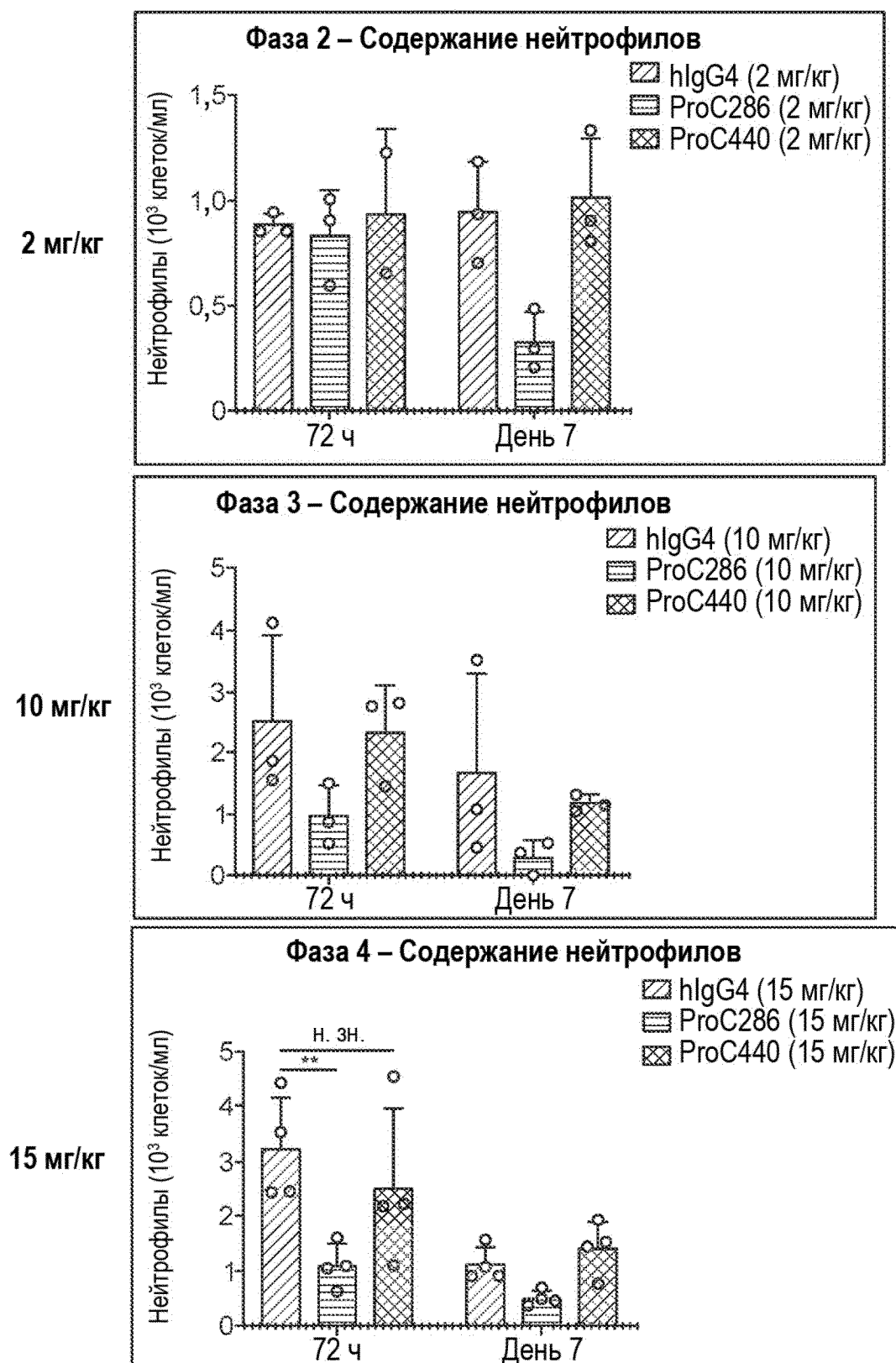
Фиг. 23 (Продолжение)



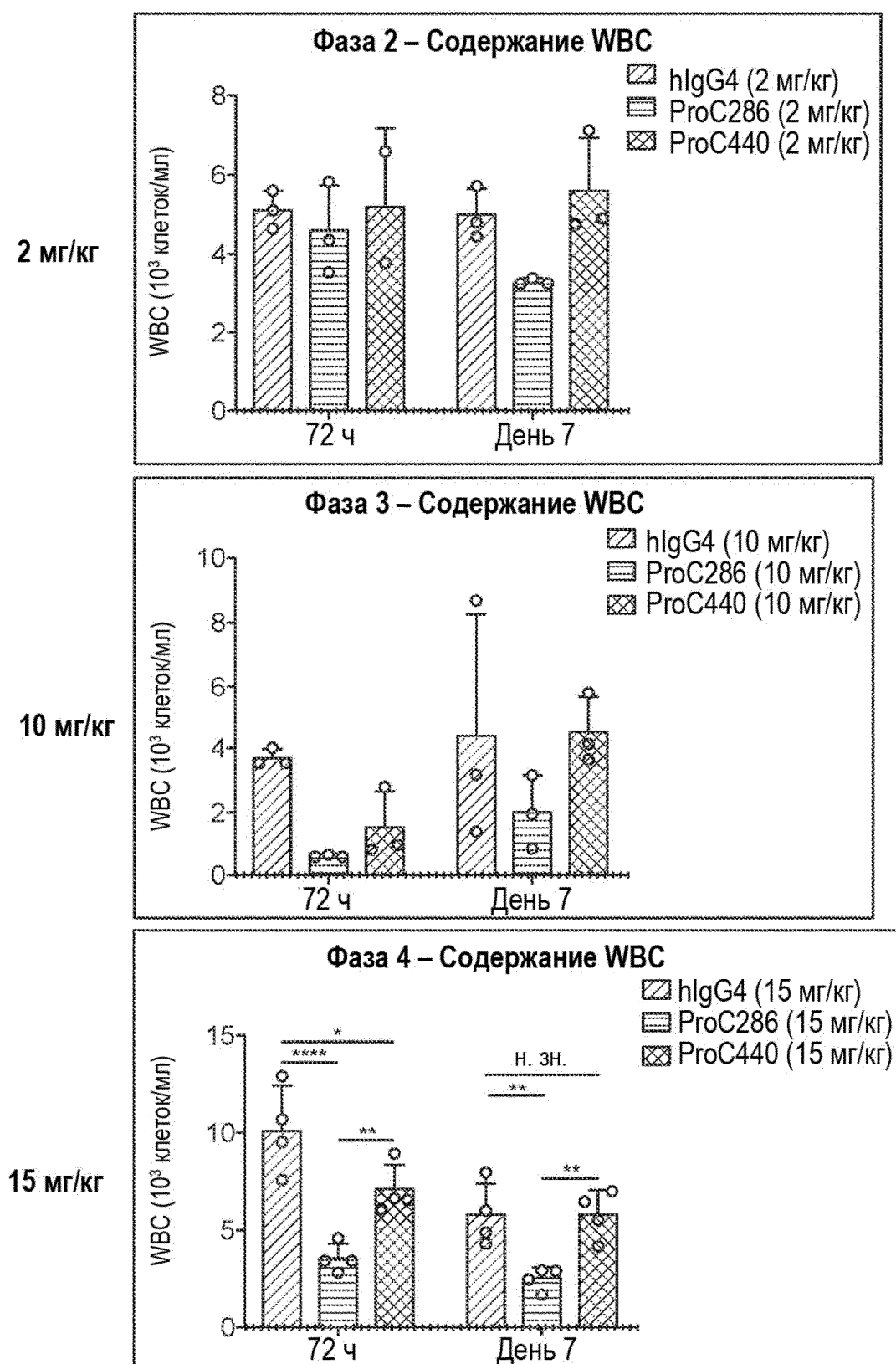
Фиг. 23 (Продолжение)



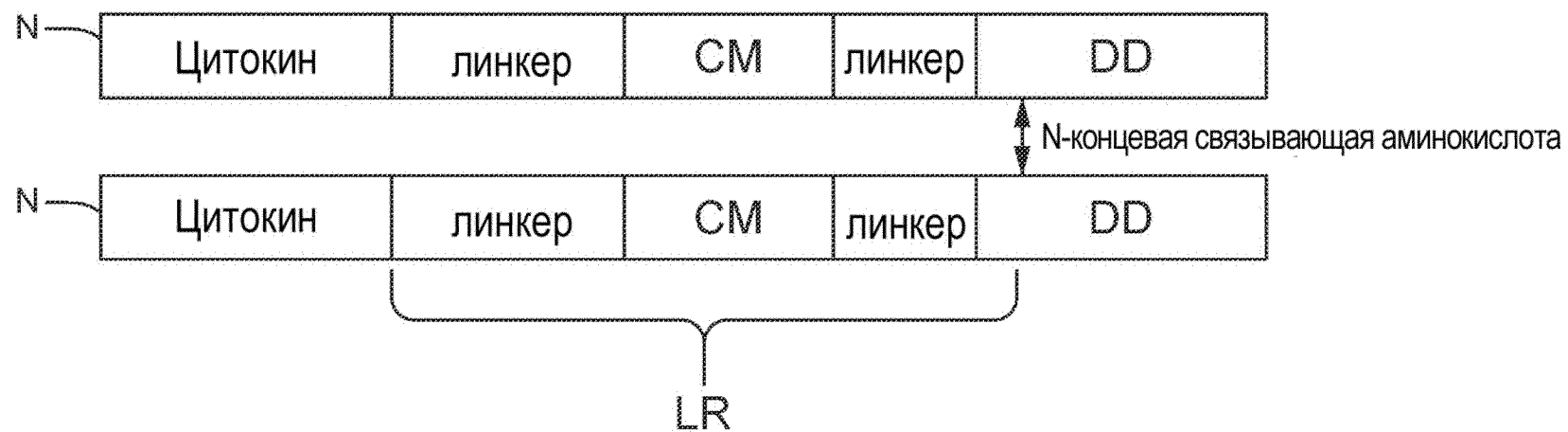
Фиг. 24



Фиг. 24 (Продолжение)



Фиг. 24 (Продолжение)



Фиг. 25