(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292798 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.27

(22) Дата подачи заявки
2021.03.31

(51) Int. Cl. *A61P 37/04* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)

(54) МАСКИРОВАННЫЕ ЦИТОКИНЫ IL-12 И ПРОДУКТЫ ИХ РАСЩЕПЛЕНИЯ

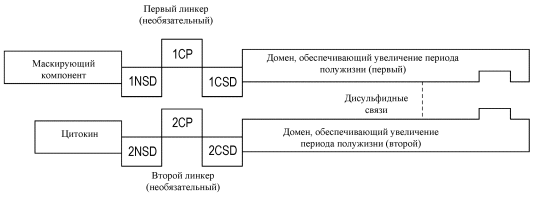
(31) **63/003,842; 63/118,579; 63/127,893**
(32) **2020.04.01; 2020.11.25; 2020.12.18**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/025107**
(87) **WO 2021/202678 2021.10.07**

(71) Заявитель:
КСИЛИО ДИВЕЛОПМЕНТ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Розенфельд Рафаэль, Эскиосак Угур, Цю Хуавэй, Джонсон Паркер, Дженкинс Курт Аллен, Педерцоли-Рибель Магали, Томар Дхирадж Сингх, О'Доннелл Ребека Кей (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к маскированным цитокинам IL-12, содержащим цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, маскирующий компонент и протеолитически расщепляемый линкер. Маскирующий компонент маскирует цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент с обеспечением таким образом снижения или предотвращения связывания цитокина IL или его функционального фрагмента с их когнатным рецептором, однако после протеолитического расщепления расщепляемого линкера в целевом сайте цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент становятся активированными, что делает их способными или более способными связываться с их когнатным рецептором.



202292798 A1

202292798 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575747EA/030

МАСКИРОВАННЫЕ ЦИТОКИНЫ IL-12 И ПРОДУКТЫ ИХ РАСЩЕПЛЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США под серийным № 63/003842, поданной 1 апреля 2020 года; № 63/118579, поданной 25 ноября 2020 года, и № 63/127893, поданной 18 декабря 2020 года; каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ВИДЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА В ФОРМАТЕ ASCII

Содержание следующего представления в виде текстового файла в формате ASCII включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (название файла: 737762002840SEQLIST.TXT, дата записи: 26 марта 2021 года, размер: 1000 Кб).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к маскированным цитокинам IL-12 и способам, связанным с их применением и изготовлением. Настоящее изобретение также относится к продуктам расщепления указанных маскированных цитокинов IL-12 и способам, связанным с их применением.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Рак представляет собой вторую ведущую причину смерти в Соединенных Штатах Америки, на него приходится больше смертей, чем на следующие пять ведущих причин: хроническое респираторное заболевание, инсульт, несчастные случаи, болезнь Альцгеймера и диабет. Несмотря на то, что удалось достигнуть значительных успехов, особенно в случае видов направленной терапии, в данной области техники сохраняется большой объем работы, которую еще предстоит выполнить. В иммунотерапии и в отрасли данной области, иммуноонкологии, создаются эффективные и перспективные терапевтические возможности для лечения злокачественных новообразований. В частности, в настоящее время признано, что одной из характерных особенностей рака является уклонение от распознавания иммунной системой, и ценой значительных усилий были идентифицированы мишени и разработаны виды терапии, направленные на данные мишени, обеспечивающие возобновление активности иммунной системы для распознавания и лечения рака.

Цитокины можно классифицировать различными способами, например, на основании их трехмерной структуры. Некоторые цитокины классифицируются как являющиеся гетеродимерными. Примеры гетеродимерных цитокинов включают IL-12 и IL-23. Цитокин IL-12 представляет собой гетеродимер, содержащий субъединицы p35 и p40.

Цитокиновая терапия представляет собой эффективную стратегию стимуляции иммунной системы для индуцирования противоопухолевой цитотоксичности. В частности, алдеслейкин, рекомбинантная форма интерлейкина-2 (IL-2), был одобрен FDA для лечения

метастатической почечноклеточной карциномы и меланомы. К сожалению, цитокины, которые вводятся пациентам, обычно характеризуются весьма коротким периодом полужизни, таким образом требуя частого введения доз. Например, в инструкции по применению алдеслейкина, представленного на рынке под торговым названием Proleukin, указано, что лекарственное средство демонстрировало период полужизни, составляющий 85 минут, у пациентов, которые получали 5-минутную внутривенную (IV) инфузию. Кроме того, введение высоких доз цитокина может обуславливать нежелательные исходы для здоровья, такие как транссудация, вследствие системной активации иммунной системы. Данные наблюдения иллюстрируют потребность в разработке терапевтических средств на основе цитокина IL-2, которые будут эффективно нацеливаться на опухоли, без побочных эффектов, ассоциированных с активацией иммунной системы.

В данном документе предусмотрены маскированные цитокины IL-12, продукты расщепления указанных маскированных цитокинов IL-12 и композиции на их основе, а также способы их применения для удовлетворения данной потребности.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Раскрытое изобретение относится к цитокинам IL-12 или их функциональным фрагментам, которые сконструированы таким образом, что они являются маскированными с помощью маскирующего компонента в одном или более рецептор-связывающих сайтах цитокина IL-12 или его функционального фрагмента. Цитокины IL-12 сконструированы таким образом, что они поддаются активации протеазой в целевом сайте, например, в микроокружении опухоли, что обеспечивается включением протеолитически расщепляемого линкера. В конструкции маскированного цитокина маскирующий компонент снижает или предотвращает связывание цитокина IL-12 или его функционального фрагмента с его когнатным рецептором. После протеолитического расщепления расщепляемого линкера в целевом сайте цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент становятся активированными, что делает их способными или более способными связываться с их когнатным рецептором.

В данном документе предусмотрен маскированный цитокин IL-12, содержащий гетеродимер белка, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую

N’ **HL1-L1-MM** C’

и вторую полипептидную цепь, содержащую

N’ **HL2-L2-C** C’,

где HL1 представляет собой первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, L1 представляет собой первый линкер, MM представляет собой маскирующий компонент, HL2 представляет собой второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, L2 представляет собой второй линкер, и C представляет собой цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент,

где первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, ассоциирован со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и

где один из первого линкера или второго линкера содержит протеолитически расщепляемый пептид.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12 или его функциональный фрагмент содержат полипептид IL-12p40 или его функциональный фрагмент, ковалентно связанные с полипептидом IL-12p35 или его функциональным фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления длина линкера IL-12p40 - IL-12p35 составляет 5-20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления линкер IL-12p40 - IL-12p35 характеризуется высоким содержанием аминокислотных остатков G и S.

В некоторых вариантах осуществления линкер IL-12p40 - IL-12p35 содержит SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 предусматривает по меньшей мере одну аминокислотную модификацию GAG-связывающего домена (KSKREKKDRV) по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 57.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность, предусматривающую одну или более мутаций с заменой цистеина по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p35 содержит SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p35 содержит SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный

фрагмент содержат SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат SEQ ID NO: 62.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент предусматривает рецептор цитокина IL-12 или его субъединицу или функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит внеклеточный домен IL-12Rβ1 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-237 IL-12Rβ1 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-545 IL-12Rβ1 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит внеклеточный домен IL-12Rβ2 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-212 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-222 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 8, или маскирующий компонент содержит остатки 24-227 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 9, где необязательно указанные модификации представляют собой мутации с заменой цистеина.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-622 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления длина расщепляемого пептида составляет 6-10 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45.

В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит

N' **HL1-нерасщепляемый L1-MM** C',

и вторая полипептидная цепь содержит

N' **HL2-расщепляемый L2-C** C'

В некоторых вариантах осуществления длина нерасщепляемого линкера составляет 3-18 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления длина нерасщепляемого линкера составляет 3-15 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер характеризуется высоким содержанием аминокислотных остатков G и S.

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит $[(G)_nS]$, где n равняется 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 54 (GGSGGSGGSGGSGGSSGP).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 55 (PGGSGP).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 56 (GGSPG).

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит протеолитически расщепляемый пептид (CP), фланкированный с обеих сторон спейсерным доменом (SD):

SD1-CP-SD2,

где SD1 и SD2 являются различными таким образом, что первая полипептидная цепь содержит

N' **HL1-нерасщепляемый L1-MM** C',

и вторая полипептидная цепь содержит

N' **HL2-SD1-CP-SD2 -C** C'.

В некоторых вариантах осуществления длина первого спейсерного домена (SD1) составляет 3-10 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления SD1 содержит SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления SD1 содержит SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления длина второго спейсерного домена (SD2) составляет 3-6 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления SD2 содержит SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления протеолитически расщепляемый линкер содержит SD1-CP-SD2, где SD1 представляет собой первый спейсерный домен, CP представляет собой расщепляемый пептид, и SD2 представляет собой второй спейсерный домен, и где CP характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 44, и SD2 характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления протеолитически расщепляемый линкер содержит SD1-CP-SD2, где SD1 представляет собой первый спейсерный домен, CP представляет собой расщепляемый пептид, и SD2 представляет собой второй спейсерный домен, и где CP характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 45, и SD2 характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 46. (GGSGGSMPYDLYHPSGP)

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 47. (GGSGGSGGSMPYDLYHPSGP)

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 48. (GGSGGSDSGGFMLTSGP)

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 49. (GGSGGSGGSDSGGFMLTSGP)

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 50. (GGSGGSRAAAVKSPSGP)

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 51. (GGSGGSGGSRAAAVKSPSGP)

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 52. (GGSGGSISSGLLSGRSSGP)

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 53. (GGSGGSGGSISSGLLSGRSSGP)

В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит первый Fc-домен IgG1 или его фрагмент, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит второй Fc-домен IgG1 или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и/или второго Fc-доменов предусматривает наличие одной или более модификаций, которые способствуют нековалентной ассоциации первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни.

В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 27 (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 28 (S354C, T366W, N297A и I253A).

В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40.

В данном документе предусмотрен продукт расщепления, способный связываться с IL-12R, при этом продукт расщепления содержит цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, получаемые посредством протеолитического расщепления расщепляемого пептида в маскированном цитокине IL-12, как определено в любом из утверждений или вариантов осуществления, описанных в данном документе.

В данном документе предусмотрен продукт расщепления маскированного цитокина IL-12, где продукт расщепления способен связываться с IL-12R, при этом продукт расщепления содержит полипептид, содержащий

PCP-SD2-C,

где PCP представляет собой часть протеолитически расщепляемого пептида; SD2 представляет собой спейсерный домен, и C представляет собой цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления PCP представляет собой часть протеолитически расщепляемого пептида, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления SD2 представляет собой спейсерный домен, описанный в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления C представляет собой цитокин IL-12 или его

функциональный фрагмент, описанные в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29.

В данном документе предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая любой из маскированных цитокинов IL-12, описанных в данном документе.

В данном документе предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая одну из цепей любого из маскированных цитокинов IL-12, описанных в данном документе.

В данном документе предусмотрен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе.

В данном документе предусмотрен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую маскированный цитокин IL-12, описанный в данном документе.

В данном документе предусмотрен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую одну из цепей маскированного цитокина IL-12, описанного в данном документе.

В данном документе предусмотрена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку HEK. В другом варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

В данном документе предусмотрена композиция, содержащая любой из маскированных цитокинов IL-12, описанных в данном документе.

В данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая любой из маскированных цитокинов IL-12, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представлена в виде единичной дозированной лекарственной формы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для внутривенного введения и представлена в виде единичной дозированной лекарственной формы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для инъекции и представлена в виде единичной дозированной лекарственной формы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой жидкость и представлена в виде единичной дозированной лекарственной формы.

В данном документе предусмотрен набор, содержащий маскированный цитокин IL-12, описанный в данном документе, или композицию, описанную в данном документе, или фармацевтическую композицию, описанную в данном документе.

В данном документе предусмотрен способ получения маскированного цитокина IL-12, описанного в данном документе, включающий культивирование клетки-хозяина, описанной в данном документе, в условиях, обеспечивающих получение маскированного цитокина IL-12.

В данном документе предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая продукт расщепления, описанный в данном документе.

В данном документе предусмотрена композиция, содержащая продукт расщепления, описанный в данном документе.

В данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая продукт расщепления, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В данном документе предусмотрен маскированный цитокин IL-12, описанный в данном документе, для применения в медицине.

В данном документе предусмотрен продукт расщепления, описанный в данном документе, для применения в медицине.

В данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества маскированного цитокина IL-12, описанного в данном документе.

В данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества композиции, описанной в данном документе.

В данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

В данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества маскированного цитокина IL-12, описанного в данном документе, где маскированный цитокин протеолитически расщепляется *in vivo* с получением продукта расщепления, описанного в данном документе.

В данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения рака у субъекта, при этом способ включает стадию получения продукта расщепления *in vivo*, который способен связываться с его когнатным рецептором, при этом продукт расщепления описан в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль.

В данном документе предусмотрен маскированный цитокин IL-12, описанный в данном документе, для применения в лечении или предупреждении рака.

В данном документе предусмотрен маскированный цитокин IL-12, описанный в данном документе, для применения в способе лечения или предупреждения рака, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества маскированного цитокина IL-12, где маскированный цитокин протеолитически расщепляется *in vivo* с получением

продукта расщепления, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль.

В данном документе предусмотрен продукт расщепления, описанный в данном документе, для применения в лечении или предупреждении рака.

В данном документе предусмотрен продукт расщепления, описанный в данном документе, для применения в способе лечения или предупреждения рака, при этом способ включает стадию введения маскированного цитокина, описанного в данном документе, пациенту, с обеспечением таким образом получения продукта расщепления посредством протеолитического расщепления маскированного цитокина *in vivo*.

В данном документе предусмотрен продукт расщепления, описанный в данном документе, для применения в способе лечения или предупреждения рака у субъекта, при этом способ включает стадию получения продукта расщепления посредством протеолитического расщепления *in vivo* из маскированного цитокина, описанного в данном документе, который был введен субъекту.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль.

В данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения в лечении или предупреждении рака.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **ФИГ. 1** показана структура иллюстративных вариантов осуществления маскированного цитокина, которая содержит маскирующий компонент, цитокин или его функциональный фрагмент («цитокин»), домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и первый линкер, который предусматривает первый расщепляемый пептид («1CP»), первый N-концевой спейсерный домен («1NSD») и первый C-концевой спейсерный домен («1CSD»). Данные иллюстративные варианты осуществления также содержат второй линкер, который предусматривает второй расщепляемый пептид («2CP»), второй N-концевой спейсерный домен («2NSD») и второй C-концевой спейсерный домен («2CSD»). Как показано стрелками, хотя для иллюстративных вариантов осуществления показано, что маскирующий компонент соединен с первым линкером, и цитокин или его функциональный фрагмент соединены с первым линкером и вторым линкером, маскирующий компонент и цитокин или его функциональный фрагмент можно менять местами таким образом, что цитокин или его функциональный фрагмент соединяется с первым линкером, и маскирующий компонент соединяется с первым линкером и вторым линкером. На **ФИГ. 1** показана структура иллюстративного варианта осуществления маскированного цитокина в виде мономера.

На **ФИГ. 2** показана структура иллюстративного варианта осуществления маскированного цитокина, которая содержит маскирующий компонент, цитокин или его функциональный фрагмент («цитокин»), первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни. Иллюстративный вариант осуществления, показанный на **ФИГ. 2**, также содержит первый

линкер, который предусматривает первый расщепляемый пептид («1CP»), первый N-концевой спейсерный домен («1NSD») и первый C-концевой спейсерный домен («1CSD»), и второй линкер, который предусматривает второй расщепляемый пептид («2CP»), второй N-концевой спейсерный домен («2NSD») и второй C-концевой спейсерный домен («2CSD»). Иллюстративные первый и второй домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни, предусматривают наличие модификаций «выступы-во-впадины», которые обеспечивают ассоциацию первого домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни, со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, как показано, с помощью «впадины» в первом домене, обеспечивающем увеличение периода полужизни, и «выступа» во втором домене, обеспечивающем увеличение периода полужизни. Первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, также показаны как ассоциирующие, по меньшей мере частично, за счет образования дисульфидных связей. Следует понимать, что, несмотря на то, что «впадина» изображена в качестве части первого домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни (соединенного с маскирующим компонентом), и «выступ» изображен в качестве части второго домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни (соединенного с цитокином), «впадина» и «выступ» в качестве альтернативы могут быть включены во второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, соответственно таким образом, что «впадина» будет представлять собой часть второго домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни (соединенного с цитокином), и «выступ» будет представлять собой часть первого домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни (соединенного с маскирующим компонентом).

На **ФИГ. 3A-3B** показаны иллюстративные варианты осуществления маскированных цитокинов до (слева) и после (справа) расщепления протеазой, как, например, в микроокружении опухоли. На **ФИГ. 3A-3B** показаны иллюстративные варианты осуществления маскированного цитокина IL-2. Расщепление протеазой обеспечивает высвобождение маскирующего компонента (например, IL-2Rβ, как показано на **ФИГ. 3B**) или обеспечивает высвобождение IL-2 (**ФИГ. 3A**).

На **ФИГ. 4** показан анализ методом SDS-PAGE на проточных (FT) образцах (т. е. белках, которые не связывались с колонкой с белком A) и элюированных (E) образцах (т. е. белках, которые связывались с колонкой с белком A и элюировались из нее) после получения и очистки конструкций IL-2 (AK304, AK305, AK307, AK308, AK309, AK310, AK311, AK312, AK313, AK314 и AK315).

На **ФИГ. 5A-5D** показаны результаты анализа методом SPR, в ходе которого тестировали связывание иллюстративных конструкций маскированного полипептида IL-2 (AK168) или контроля, представляющего собой rhIL-2, с CD25-Fc. На **ФИГ. 5A** показано взаимодействие между AK168 и CD25-Fc, на **ФИГ. 5B** показано взаимодействие между AK168, активированным с помощью MMP, и CD25-Fc, и на **ФИГ.5C** показано взаимодействие между контролем, представляющим собой рекомбинантный IL-2 человека

(rhIL-2), и CD25-Fc. На **ФИГ. 5D** представлена таблица сводных данных, полученных для константы ассоциации (ka), константы диссоциации (kd), равновесной константы диссоциации (KD), а также значения Chi2 и U-значения для каждого взаимодействия.

На **ФИГ. 6A-6D** показаны результаты анализа методом SPR, в ходе которого тестировали связывание иллюстративных конструкций маскированного полипептида IL-2 (AK111) или контроля, представляющего собой rhIL-2, с CD122-Fc. На **ФИГ. 6A** показано взаимодействие между AK111 и CD122-Fc, на **ФИГ. 6B** показано взаимодействие между AK111, активированным протеазой, и CD122-Fc, и на **ФИГ. 6C** показано взаимодействие между контролем, представляющим собой рекомбинантный IL-2 человека (rhIL-2), и CD122-Fc. На **ФИГ. 6D** представлена таблица сводных данных, полученных для константы ассоциации (ka), константы диссоциации (kd), равновесной константы диссоциации (KD), а также значения Chi2 и U-значения для каждого взаимодействия.

На **ФИГ. 7A** показан иллюстративный вариант осуществления маскированных цитокинов до (слева) и после (справа) расщепления протеазой, как, например, в микроокружении опухоли. На **ФИГ. 7B** показан анализ методом SDS-PAGE иллюстративной конструкции маскированного полипептида IL-2, которую инкубировали в отсутствие (левый ряд) или в присутствии (правый ряд) протеазы MMP10, который демонстрирует освобождение IL-2 от Fc-части.

На **ФИГ. 8A-8D** показана активация STAT5 (%) в PBMC, обработанных конструкцией AK032, AK035, AK041 или rhIL-2 в качестве контроля. Уровни активации STAT5 (%) показаны для NK-клеток, CD8+ T-клеток, эффекторных T-клеток (Teff) и регуляторных T-клеток (Treg), как определено после инкубации с rhIL-2 (**ФИГ. 8A**), AK032 (**ФИГ. 8B**), AK035 (**ФИГ.8C**) или AK041 (**ФИГ. 8D**).

На **ФИГ. 9A-9C** показана активация STAT5 (%) в PBMC, обработанных конструкцией AK081 или AK032. Тестировали конструкцию AK081 с предшествующим воздействием MMP10 и без него. Также тестировали изотипический контроль, а также отрицательный контроль без обработки с помощью IL-2. Уровни активации STAT5 (%) показаны для NK-клеток (**ФИГ. 9A**), CD8+ T-клеток (**ФИГ. 9C**) и CD4+ T-клеток (**ФИГ. 9B**).

На **ФИГ. 10A-10D** показаны результаты исследований активации STAT5 на PBMC с применением конструкций AK081 и AK111, а также контролей, которые включали rhIL-2 и антитело к RSV. Также тестировали контроль без обработки. Также показана EC50 (пМ) для обработок с помощью rhIL-2, AK081 и AK111. Результаты активации STAT5 (%) показаны для CD4+FoxP3+CD25+ клеток (**ФИГ. 10A**), CD8+ клеток (**ФИГ. 10B**) и CD4+FoxP3-CD25- клеток (**ФИГ. 10C**). На **ФИГ. 10D** представлена EC50 (пМ) и данные по кратности изменения для конструкций AK081, AK111, а также контроля, представляющего собой rhIL-2.

На **ФИГ. 11A-11D** показаны результаты исследований активации STAT5 на PBMC с применением конструкций AK167 и AK168, а также контролей, которые включали rhIL-2 и антитело к RSV. Также тестировали контроль без обработки. Также показана EC50 (пМ)

для обработок с помощью rhIL-2, AK167 и AK168. Активация STAT5 (%) показана для CD4+FoxP3+CD25+ клеток (**ФИГ. 11A**), CD8+ клеток (**ФИГ. 11B**) и CD4+FoxP3-CD25- клеток (**ФИГ. 11C**). На **ФИГ. 11D** представлена EC50 (пМ) и данные по кратности изменения для конструкций AK167 и AK168, а также контроля, представляющего собой rhIL-2.

На **ФИГ. 12A-12D** показана активация STAT5 (%) на PBMC, обработанных конструкцией AK165 или AK166, или для изотипического контроля или контроля, представляющего собой IL-2-Fc, которые предварительно подвергались (+ MMP10) или не подвергались воздействию протеазы MMP10. Обозначения, показанные на **ФИГ. 12A**, также применимы для **ФИГ. 12B**, и обозначения, показанные на **ФИГ. 12C**, также применимы **для ФИГ. 12D**. Активация STAT5 (%) показана для регуляторных CD4+FoxP3+ T-клеток (**ФИГ. 12A**), хелперных CD4+FoxP3- T-клеток (**ФИГ. 12B**), цитотоксических CD8+ T-клеток (**ФИГ. 12C**) и CD56+ NK-клеток (**ФИГ. 12D**).

На **ФИГ. 13A-13C** показана активация STAT5 (%) на PBMC, обработанных конструкцией AK109 или AK110, или изотипическим контролем, или контролем, представляющим собой IL-2-Fc, которые предварительно подвергались (+ MMP10) или не подвергались воздействию протеазы MMP10. Обозначения, показанные на **ФИГ. 12B**, также применимы для **ФИГ. 13A**. Активация STAT5 (%) показана для NK-клеток (**ФИГ. 13A**), CD8 клеток (**ФИГ. 13B**) и CD4 клеток (**ФИГ. 13C**).

На **ФИГ. 14A-14D** показаны результаты исследований активации STAT5 на PBMC с применением конструкций AK211, AK235, AK253, AK306, AK310, AK314 и AK316, а также контроля, представляющего собой rhIL-2. Активация STAT5 (%) показана для CD3+CD4+FoxP3+ клеток (**ФИГ. 14A**), CD3+CD4+FoxP3- клеток (**ФИГ. 14B**) и CD3+CD8+ клеток (**ФИГ. 14C**). На **ФИГ. 14D** представлены данные по EC50 для каждой из тестируемых конструкций, а также контроля, представляющего собой rhIL-2.

На **ФИГ. 15A-15D** показаны результаты исследований активации STAT5 на PBMC с применением конструкций AK081, AK167, AK216, AK218, AK219, AK220 и AK223, которые были активированы протеазой, а также контроля, представляющего собой rhIL-2. Активация STAT5 (%) показана для CD4+FoxP3+CD25+ регуляторных T-клеток (**ФИГ. 15A**), CD4+FoxP3-CD25- клеток (**ФИГ. 15B**) и CD8+ клеток (**ФИГ. 15C**). На **ФИГ. 15D** представлены данные по EC50 для каждой из тестируемых конструкций, а также контроля, представляющего собой rhIL-2.

На **ФИГ. 16A-16C** показана активация STAT5 (%) на PBMC, обработанных конструкцией AK081, AK189, AK190 или AK210 или контролем, представляющим собой антитело к RSV. Обозначения, показанные на **ФИГ. 16A**, также применимы для **ФИГ.16B** и **16C**. Активация STAT5 (%) показана для регуляторных T-клеток (**ФИГ. 16A**), хелперных CD4 T-клеток (**ФИГ. 16B**) и CD8 клеток (**ФИГ. 16C**).

На **ФИГ. 17A-17C** показана активация STAT5 (%) на PBMC, обработанных конструкцией AK167, AK191, AK192 или AK193 или контролем, представляющим собой антитело к RSV. Обозначения, показанные на **ФИГ. 17A**, также применимы для **ФИГ. 17B**

и **17C**. Активация STAT5 (%) показана для регуляторных Т-клеток (**ФИГ. 17A**), хелперных CD4 Т-клеток (**ФИГ. 17B**) и CD8 клеток (**ФИГ. 17C**).

На **ФИГ. 18A-18D** показаны результаты фармакокинетических исследований, проводившихся на мышах, несущих опухоль, с применением конструкции AK032, AK081, AK111, AK167 или AK168 или контроля, представляющего собой антитело к RSV. На **ФИГ. 18A** представлено упрощенное изображение структуры каждой из тестируемых конструкций. На **ФИГ. 18B** показаны уровни Fc в плазме крови (мкг/мл), определенные посредством выявления IgG человека, на **ФИГ. 18C** показаны уровни Fc-CD122 в плазме крови (мкг/мл), определенные посредством выявления CD 122 человека, и на **ФИГ. 18D** показаны уровни Fc-IL2 в плазме крови (мкг/мл), определенные посредством выявления IL-2 человека. Перед стадией выявления антитело к IG человека применяли в качестве антитела захвата.

На **ФИГ. 19A-19D** показаны результаты фармакокинетических исследований, проводившихся на мышах, несущих опухоль, с применением конструкции AK167, AK191 AK197, AK203, AK209 или AK211 или контроля, представляющего собой антитело к RSV. На **ФИГ. 19A** представлено упрощенное изображение структуры каждой из тестируемых конструкций. На **ФИГ. 19B** показаны уровни Fc в плазме крови (мкг/мл), определенные посредством выявления IgG человека, на**ФИГ. 19C** показаны уровни Fc-IL2 в плазме крови (мкг/мл), определенные посредством выявления IL-2 человека, и на **ФИГ. 19D** показаны уровни Fc-CD122 в плазме крови (мкг/мл), определенные посредством выявления CD 122 человека. Перед стадией выявления антитело к IG человека применяли в качестве антитела захвата.

На **ФИГ. 20A-20L** показаны результаты исследований, в ходе которых тестировали ответы in vivo в виде процентных долей CD4, CD8, NK и Treg в селезенке, крови и опухоли при применении конструкции AK032, AK081, AK111, AK167 или AK168 или контроля, представляющего собой IgG к RSV. Для ткани селезенки показан % CD8 клеток среди CD3 клеток (**ФИГ. 20A**), % CD4 среди CD3 клеток (**ФИГ. 20B**), % NK-клеток среди CD3-клеток (**ФИГ. 20C**), % FoxP3 среди CD4 клеток (**ФИГ. 20D**). Для крови показан % CD8 клеток среди CD3 клеток (**ФИГ. 20E**), % CD4 среди CD3 клеток (**ФИГ. 20F**), % NK-клеток среди CD3-клеток (**ФИГ. 20G**), % FoxP3 среди CD4 клеток (**ФИГ. 20H**). Для ткани опухоли показан % CD8 клеток среди CD3 клеток (**ФИГ. 20I**), % CD4 среди CD3 клеток (**ФИГ. 20J**), % NK-клеток среди CD3-клеток (**ФИГ. 20K**), % FoxP3 среди CD4 клеток (**ФИГ. 20L**).

На **ФИГ. 21A-21L** показаны результаты исследований, в ходе которых тестировали ответы in vivo в виде процентных долей CD4, CD8, NK и Treg в селезенке, крови и опухоли при применении конструкции AK167, AK168, AK191, AK197, AK203, AK209 или AK211 или контроля, представляющего собой IgG к RSV. Для ткани селезенки показан % CD8 клеток среди CD3 клеток (**ФИГ. 21A**), % CD4 среди CD3 клеток (**ФИГ. 21B**), % NK-клеток среди CD3-клеток (**ФИГ. 21C**), % FoxP3 среди CD4 клеток (**ФИГ. 21D**). Для крови показан % CD8 клеток среди CD3 клеток (**ФИГ.21E**), % CD4 среди CD3 клеток (**ФИГ. 21F**), % NK-клеток среди CD3-клеток (**ФИГ.21G**), % FoxP3 среди CD4 клеток (**ФИГ. 21H**). Для ткани

опухоли показан % CD8 клеток среди CD3 клеток (**ФИГ. 21I**), % CD4 среди CD3 клеток (**ФИГ. 21J**), % NK-клеток среди CD3-клеток (**ФИГ. 21K**), % FoxP3 среди CD4 клеток (**ФИГ. 21L**).

На **ФИГ. 22A-22L** показаны результаты исследований, в ходе которых тестировали ответы in vivo в виде процентных долей CD4, CD8, NK и Treg в селезенке, крови и опухоли при применении конструкции AK235, AK191, AK192, AK193, AK210, AK189, AK190 или AK211 или контроля, представляющего собой IgG к RSV. Для ткани селезенки показан % CD8 клеток среди CD3 клеток (**ФИГ. 22A**), % CD4 среди CD3 клеток (**ФИГ. 22B**), % NK-клеток среди CD3-клеток (**ФИГ. 22C**), % FoxP3 среди CD4 клеток (**ФИГ. 22D**). Для крови показан % CD8 клеток среди CD3 клеток (**ФИГ. 22E**), % CD4 среди CD3 клеток (**ФИГ. 22F**), % NK-клеток среди CD3-клеток (**ФИГ. 22G**), % FoxP3 среди CD4 клеток (**ФИГ. 22H**). Для ткани опухоли показан % CD8 клеток среди CD3 клеток (**ФИГ. 22I**), % CD4 среди CD3 клеток (**ФИГ. 22J**), % NK-клеток среди CD3-клеток (**ФИГ. 22K**), % FoxP3 среди CD4 клеток (**ФИГ. 22L**).

На **ФИГ. 23A-23I** показаны результаты активации Т-клеток in vivo в селезенке, крови и опухоли при применении конструкции AK235, AK191, AK192, AK193, AK210, AK189, AK190 или AK211. Активацию Т-клеток измеряли в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI) CD25 на CD8+ Т-клетках (**ФИГ. 23A; ФИГ. 23D; ФИГ. 23G**), CD4+ Т-клетках (**ФИГ. 23B; ФИГ. 23E; ФИГ. 23H**) или Foxp3+ клетках (**ФИГ. 23C; ФИГ. 23F; ФИГ. 23I**) в селезенке, крови и опухоли. Статистический анализ выполняли с применением однофакторного ANOVA при сравнении с нерасщепляемой конструкцией AK211.

На **ФИГ. 24A-24D** показаны результаты исследований, в ходе которых тестировали расщепление in vivo иллюстративных конструкций маскированного полипептида IL-2 AK168 (последовательность расщепляемого пептида: MPYDLYHP) и AK209 (последовательность расщепляемого пептида: VPLSLY; SEQ ID NO: 15). На **ФИГ. 24E** показаны результаты фармакокинетического исследования общей концентрации IgG в плазме крови (мкг/мл) для общих уровней конструкций AK167, AK168 и AK209 и для уровней нерасщепленных форм каждой конструкции.

На **ФИГ. 25A-25D** показаны результаты исследования in vivo, в ходе которого оценивали транссудацию, с применением иллюстративной конструкции маскированного полипептида IL-2 AK111 или AK168, или конструкции немаскированного полипептида IL-2 AK081 или AK167, или контроля, представляющего собой антитело к RSV. На **ФИГ. 25A** показана процентная доля (%) потери веса тела, и на **ФИГ. 25B, 25C** и **25D** показан вес в граммах для печени, легкого и селезенки соответственно для каждого.

На **ФИГ. 26A** и **26B** показаны результаты исследования in vivo, в ходе которого оценивали степень транссудации, определяемую посредством измерения степени транссудации красителя в ткань печени и легкого после введения конструкции AK081, AK111, AK167 или AK168 или контроля, представляющего собой антитело к RSV. Степень транссудации красителя в печень (**ФИГ. 26A**) и легкое (**ФИГ. 26B**) измеряли на основании поглощения при 650 нм.

На **ФИГ. 27A** и **27B** показаны результаты исследования in vivo, в ходе которого оценивали степень транссудации, определяемую посредством измерения степени периваскулярной инвазии мононуклеарных клеток в ткань печени и легкого после введения конструкции AK081, AK111, AK167 или AK168 или контроля, представляющего собой антитело к RSV. Для каждого изображено среднее число мононуклеарных клеток в печени (**ФИГ. 27A**) и среднее число мононуклеарных клеток в легком (**ФИГ. 27B**).

На **ФИГ. 28A** и **28B** показаны результаты исследования с использованием модели с сингенной опухолью, в ходе которого оценивали объем опухоли и вес тела на протяжении курса обработки конструкцией AK032, AK081, AK111, AK167 или AK168 или контролем, представляющим собой антитело к RSV**. На ФИГ. 28A** показаны данные по объему опухоли на протяжении обработки, и на **ФИГ. 28B** показаны данные по процентной доле (%) изменения веса тела на протяжении курса обработки.

На **ФИГ. 29A и 29B** показано, что AK471 с мутацией I253A в FcRn индуцировала устойчивое размножение CD8 T-клеток в TME, оставаясь при этом неактивной по периферии.

На **ФИГ. 30A-30C** показано, что AK471 характеризуется незначительно более коротким периодом полужизни по сравнению с аглико-hIgG1

На **ФИГ. 31A-31C** показано, что в случае AK471 отсутствует подтверждение расщепления или декапитации в плазме крови

На **ФИГ. 32** показаны иллюстративные форматы конструкции IL-12.

На **ФИГ. 33A и 33B** показаны иллюстративные процессы расщепления для иллюстративных молекул AK380, AK381, и AK384 (**ФИГ. 34A**), и AK383, AK386, AK434, AK447, AK448, AK446, AK528 и AK529 (**ФИГ. 34B)**.

На **ФИГ. 34A-34D** изображено маскирование IL-12 по отношению к IL-12RB1 с применением SPR-анализа, посредством которого тестировали связывание иллюстративных конструкций маскированного полипептида IL-12 (AK384 и AK386) с rhIL-12RB1-Fc. На **ФИГ. 34A** изображено взаимодействие между AK384 и IL-12RB1-Fc, на **ФИГ. 34B** изображено взаимодействие между AK386 и IL-12RB1-Fc, и на **ФИГ. 34C** изображено взаимодействие между контролем, представляющим собой рекомбинантный IL-12 человека (rhIL-12), и IL-12RB1-Fc. На **ФИГ. 34D** представлена таблица сводных данных, полученных для константы ассоциации (ka), константы диссоциации (kd), равновесной константы диссоциации (KD), а также значения Chi^2 и U-значения для каждого взаимодействия. Вследствие формы кривых невозможно было определить точную кинетику, поэтому KD оценивается на основании скорости ассоциации. Данные результаты демонстрируют, что эти иллюстративные конструкции маскированного полипептида IL-12 (AK384 и AK386) не демонстрировали поддающегося выявлению связывания с IL-12RB1-Fc, тогда как контроль, представляющий собой rhIL-12 дикого типа, демонстрировал поддающееся выявлению связывание.

На **ФИГ. 35A-35D** изображено маскирование IL-12 по отношению к IL-12RB2 с применением SPR-анализа, посредством которого тестировали связывание

иллюстративных конструкций маскированного полипептида IL-12 (AK384 и AK386) с rhIL-12RB2-Fc. На **ФИГ. 35A** изображено взаимодействие между AK384 и IL-12RB2-Fc, на **ФИГ. 35B** изображено взаимодействие между AK386 и IL-12RB2-Fc, и на **ФИГ. 35C** изображено взаимодействие между контролем, представляющим собой рекомбинантный IL-12 человека (rhIL-12), и IL-12RB2-Fc. На **ФИГ. 35D** представлена таблица сводных данных, полученных для константы ассоциации (ka), константы диссоциации (kd), равновесной константы диссоциации (KD), а также значения Chi^2 и U-значения для каждого взаимодействия. Вследствие формы кривых невозможно было определить точную кинетику, поэтому KD оценивается на основании скорости ассоциации. Эти результаты демонстрируют, что иллюстративная конструкция маскированного полипептида IL-12 (AK386) демонстрировала слабое, но еще поддающееся выявлению связывание с IL-12RB1-Fc, в то время как контроль, представляющий собой rhIL-12 дикого типа, и иллюстративная конструкция полипептида IL-12 (AK384) демонстрировали поддающееся выявлению связывание.

На **ФИГ.36-40** показаны результаты из примера 6. На **ФИГ. 41-43** показаны результаты из примера 7. На **ФИГ. 44-52E** показаны результаты из примера 8.

На **ФИГ. 53A-53D** и **ФИГ. 54A-54F** показаны результаты SDS-PAGE и биологического анализа с применением HEK-Blue IL-2, полученные при применении иллюстративных конструкций IL-15, - AK904 и AK910, которые не предусматривают пептидный субстрат, и конструкций AK932, AK938, AK930 и AK936, которые предусматривают пептидный субстрат. На **ФИГ. 53A-53D** показаны результаты SDS-PAGE, представляющие собой изображения геля. На **ФИГ. 54A-54F** показаны результаты биологического анализа с применением HEK-Blue IL-2.

На **ФИГ. 55-68** показаны результаты из примера 11. PK/PD иллюстративных муринизированных молекул AK944, AK945, AK947 и контрольной AK948 анализировали *in vivo* на двух моделях опухолей, MB49 и B16F10.

На **ФИГ. 69-71B** показаны результаты из примера 12. У яванских макаков анализировали PK, PD, проводили общий анализ крови и биохимический анализ сыворотки крови в отношении иллюстративных молекул AK667, AK921, AK923 и контрольной AK671.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Посредством применения маскирующего компонента системные побочные эффекты вводимого цитокина IL-12 или его функционального фрагмента можно уменьшить посредством препятствования способности цитокина IL-12 или его функционального фрагмента связываться с их когнатным рецептором.

Рецептор интерлейкина 12 представляет собой рецептор цитокина I типа, связывающий интерлейкин 12. Он состоит из субъединиц бета-1 и бета-2.

При маскировании цитокина IL-12 или его функционального фрагмента с применением линкера, который содержит протеолитически расщепляемый пептид, связывающая способность, которой препятствуют посредством применением маскирующего компонента, может восстанавливаться посредством расщепления

расщепляемого пептида в микроокружении опухоли. Таким образом, предусмотренные в данном документе маскированные цитокины IL-12 сконструированы так, что они точно нацеливают фармакологическую активность к микроокружению опухоли посредством использования одной из характерных особенностей рака, - высоких локальных концентраций активной протеазы. Данное свойство микроокружения опухоли применяется для превращения системно инертной молекулы в локально активный цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент в форме продукта расщепления IL-12. Активация цитокина IL-12 или его функционального фрагмента в микроокружении опухоли значительно снижает системные виды токсичности, которые могут быть ассоциированы с лекарственными средствами, которые вводятся субъекту в активной форме. Таким образом, маскированные цитокины IL-2 по настоящему изобретению можно рассматривать как пролекарство.

Было обнаружено, что маскированные цитокины IL-12, описанные в данном документе, демонстрируют различные предпочтительные свойства. Было обнаружено, что маскированные цитокины IL-12, описанные в любой части данного документа, способны активировать иммунные клетки (пролиферацию и размножение) после протеолитического расщепления, преимущественно в микроокружении опухоли и на более низких уровнях на периферии. Было обнаружено, что маскированные цитокины IL-12, описанные в любой части данного документа, способны стимулировать эрадикацию опухоли (т. е. демонстрируют противоопухолевую активность) и подавлять метастазирование после протеолитического расщепления. Было обнаружено, что маскированные цитокины IL-12, описанные в любой части данного документа, демонстрируют предпочтительное пролонгированное воздействие лекарственного средства. Было обнаружено, что маскированные цитокины IL-12, описанные в данном документе, демонстрируют предпочтительную стабильность. Было обнаружено, что маскированные цитокины IL-12, описанные в данном документе, демонстрируют предпочтительную переносимость. Более того, было обнаружено, что маскированные цитокины IL-12, описанные в данном документе, демонстрируют предпочтительную активность.

1. «ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ» МАСКИРОВАННЫЕ ЦИТОКИНЫ

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен маскированный цитокин, содержащий маскирующий компонент в первой полипептидной цепи и цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент во второй полипептидной цепи. Такие маскированные цитокины могут называться «гетеродимерными» маскированными цитокинами.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин предусматривает гетеродимер белка, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую маскирующий компонент, соединенный с первым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, посредством первого линкера, и

вторую полипептидную цепь, содержащую цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, соединенные со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода

полужизни, посредством второго линкера,

где первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, ассоциирован со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и

где один из первого линкера или второго линкера содержит протеолитически расщепляемый пептид.

Маскирующий компонент, домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни, цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, линкеры и тип ассоциации между первым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, могут представлять собой любые из таковых, описанных в данном документе, и любые комбинации таковых, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления в первой полипептидной цепи первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, соединен с амино-концом первого линкера, и карбокси-конец первого линкера соединен с амино-концом маскирующего компонента, и во второй полипептидной цепи второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, соединен с амино-концом второго линкера, и карбокси-конец второго линкера соединен с амино-концом цитокина IL-12 или его функционального фрагмента. Это схематически показано ниже, где

первая полипептидная цепь содержит

N' **HL1-L1-MM** C',

и вторая полипептидная цепь содержит

N' **HL2-L2-C** C',

где HL1 представляет собой первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, L1 представляет собой первый линкер, MM представляет собой маскирующий компонент, HL2 представляет собой второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, L2 представляет собой второй линкер, и C представляет собой цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент.

1.1 **Цитокины IL-12**

В данном документе предусмотрен цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент для применения в маскированном цитокине или продукте его расщепления. Цитокин играет роль в передаче сигнала в клетках, в частности, в клетках иммунной системы. IL-12 представляет собой интерлейкин, который представляет собой тип цитокиновой сигнальной молекулы в иммунной системе, который регулирует виды активности лейкоцитов.

Эндогенный IL-12 существует в виде двух отдельных молекул p40 IL-12 и p35 IL-12, которые димеризуются в клетке в ходе биосинтеза.

Полные последовательности p40 IL-12 и p35 IL-12 (пропептиды, отщепленные в ходе биосинтеза) выделены жирным шрифтом):

Субъединица p40 IL-12:

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT

PEEDGITW

TLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQ

KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATL SAERV

RGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKN

LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVIC

RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

Субъединица p35 IL-12:

MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQ KARQTLE

FYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMM

ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNS ETVPQK

SSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

Зрелые формы являются следующими.

Субъединица p40 IL-12:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTL TIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK NYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEC QEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCS

Субъединица p35 IL-12:

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKD KTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVE FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLC ILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

Они экспрессируются в виде двух цепей, которые ковалентно димеризуются в ходе биосинтеза посредством дисульфидной связи между двумя субъединицами: цистеин C199 субъединицы p40 ассоциирует с цистеином C96 субъединицы p35.

«Функциональные фрагменты» цитокина IL-12 предусматривают часть полноразмерного белка цитокина, которая сохраняет рецептор-связывающую способность цитокина (например, в пределах по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с полноразмерным белком цитокина) или характеризуется модифицированной рецептор-связывающей способностью. Рецептор-связывающая способность цитокина может быть показана, например, в виде способности

цитокина связываться с когнатным рецептором цитокина или его компонентом.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент представляют собой любой встречающийся в природе белок, представляющий собой интерлейкин-2 (IL-12), или его модифицированный вариант, способные связываться с рецептором интерлейкина-12.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12 или его функциональный фрагмент содержат полипептид IL-12p40 или его функциональный фрагмент, ковалентно связанные с полипептидом IL-12p35 или его функциональным фрагментом.

Полипептид IL-12p40 или его функциональный фрагмент могут быть присоединены к первому домену, обеспечивающему увеличение периода полужизни, таким образом, что первая полипептидная цепь содержит

N' **HL1-L1-MM** C',

и вторая полипептидная цепь содержит

N' **HL2-L2-[IL-12p40-линкер-IL-12p35]** C',

где «IL-12p40» представляет собой полипептид IL-12p40 или его функциональный фрагмент, и «IL-12p35» представляет собой полипептид IL-12p35 или его функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1. Каждая из по меньшей мере одной аминокислотной модификации может представлять собой любую аминокислотную модификацию, такую как замена, вставка или делеция. В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере 5 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1.

Полипептид IL-12p40 содержит домен, связывающий гликозаминогликан (GAG). Было показано, что GAG, такие как гепарин и гепарансульфат, связывают многие факторы роста и цитокины, включая IL-12. Физиологическое значение этого связывания двоякое. Во-первых, GAG могут служить корецепторами на поверхностях клеток для поддержания высоких локальных концентраций цитокинов. Во-вторых, GAG способны регулировать уровни биологической активности факторов роста и цитокинов посредством множества механизмов, включая димеризацию и защиту от протеолитического разрушения.

GAG-связывающий домен в зрелой форме субъединицы p40 IL-12 показан ниже

жирным шрифтом:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTL TIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQ

KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATL SAERV

RGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKN

LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQG**KSKREKKDRV**FTDK TSATVIC

RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

В данном документе было показано, что модификации GAG-связывающего домена (KSKREKKDRV) повышали PK-профиль конструкций, содержащих цитокин IL-12 с мутированным GAG-связывающим доменом, без какого-либо снижения активности цитокина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 предусматривает по меньшей мере одну аминокислотную модификацию GAG-связывающего домена.В некоторых вариантах осуществления модификация GAG-связывающего домена представляет собой мутацию с делецией. В некоторых вариантах осуществления модификация GAG-связывающего домена представляет собой мутацию с делецией и по меньшей мере одну мутацию с заменой.

В некоторых вариантах осуществления GAG-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность KDNTERV. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления GAG-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность KDNTEGRV. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления GAG-связывающий домен состоит из аминокислотной последовательности KDNTERV. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления GAG-связывающий домен состоит из аминокислотной последовательности KDNTEGRV. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность, предусматривающую одну или более замен цистеина по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность, предусматривающую аминокислотную замену в положении C252 по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена в положении C252 представляет собой C252S. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах

осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность, предусматривающую одну или более замен цистеина по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, и по меньшей мере одну аминокислотную модификацию GAG-связывающего домена. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную замену в положении C252S по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, и GAG-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность KDNTERV. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную замену в положении C252S по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, и GAG-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность KDNTEGRV. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p40 состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p35 содержит SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-12p35 содержит аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2. Каждая из по меньшей мере одной аминокислотной модификации может представлять собой любую аминокислотную модификацию, такую как замена, вставка или делеция. В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере 5 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления длина линкера IL-12p40 - IL-12p35

составляет 5-20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления линкер IL-12p40 - IL-12p35 характеризуется высоким содержанием аминокислотных остатков G и S.

В некоторых вариантах осуществления линкер IL-12p40 - IL-12p35 содержит только типы аминокислотных остатков, выбранные из группы, состоящей из G и S.

В некоторых вариантах осуществления линкер IL-12p40 - IL-12p35 содержит [$(G)_nS$], где n равняется 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления линкер IL-12p40 - IL-12p35 содержит повтор (GGGGS).

В некоторых вариантах осуществления линкер IL-12p40 - IL-12p35 содержит SEQ ID NO: 3. (GGGGSGGGGSGGGGS)

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с аминокислотными последовательностями под SEQ ID NO: 1 и 2. Каждая из по меньшей мере одной аминокислотной модификации может представлять собой любую аминокислотную модификацию, такую как замена, вставка или делеция. В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотными последовательностями под SEQ ID NO: 1 и 2. В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере 5 аминокислотных замен по сравнению с аминокислотными последовательностями под SEQ ID NO: 1 и 2.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной

последовательностью под SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 62.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 64.

1.2 **Маскирующие компоненты**

В данном документе предусмотрен маскирующий компонент для применения в маскированном цитокине. Будет понятно, что маскирующий компонент отщепляется от маскированного цитокина с образованием продукта его расщепления. Маскирующий компонент маскирует цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент в маскированном цитокине, тем самым снижая или предупреждая связывание IL-цитокина или его функционального фрагмента с их когнатным рецептором.

Рецептор IL-12, бета-1 или IL-12Rβ1 являются субъединицей рецепторного комплекса IL-12. IL-12Rβ1 также известен как CD212. Этот белок связывается с интерлейкином-12 (IL-12) с низкой аффинностью. Этот белок образует олигомер с дисульфидной связью, что требуется для его IL-12-связывающей активности. Рецептор IL-12, бета-2 или IL-12Rβ2 являются субъединицей рецепторного комплекса IL-12. Было показано, что коэкспрессия белков IL-12Rβ1 и IL-12Rβ2 приводит к образованию высокоаффинных сайтов связывания IL-12.

Способы определения степени связывания белка (например, цитокина) с когнатным белком (например, рецептором цитокина) хорошо известны из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент предусматривает внеклеточный домен рецептора цитокина IL-12 или его субъединицу или функциональный

фрагмент.

Субъединица бета-1 рецептора интерлейкина-12, также называемая CD212, характеризуется последовательностью:

MEPLVTWVVPLLFLFLLSRQGAA*CRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRY*
ECSWQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWAR
NQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTPSSP
WKLGDCGPQDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSPVCVPPENPPQPQ
VRFSVEQLGQDGRRRLTLKEQPTQLELPEGCQGLAPGTEVTYRLQLHMLSCPCKAKATRT
LHLGKMPYLSGAAYNVAVISSNQFGPGLNQTWHIPADTHTEPVALNISVGTNGTTMYWPA
RAQSMTYCIEWQPVGQDGGLATCSLTAPQDPDPAGMATYSWSRESGAMGQEKCYYITIFA
SAHPEKLTLWSTVLSTYHFGGNASAAGTPHHVSVKNHSLDSVSVDWAPSLLSTCPGVLKE
YVVRCRDEDSKQVSEHPVQPTETQVTLSGLRAGVAYTVQVRADTAWLRGVWSQPQRFSIE
*VQVSD*WLIFFASLGSFLSILLVGVLGYLGL**NRAARHLCPPLPTPCASSAIEFPGGKETWQ**
WINPVDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELALDTELSLEDGD
RCKA
KM

Субъединица бета-2 рецептора интерлейкина-12 характеризуется последовательностью:

MAHTFRGCSLAFMFIITWLLIKA*KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCF*
HYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFV
GVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDY
LDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVS
RCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEFQISSKLHL
YKGSWSDWSESLRAQTPEEEPTGMLDVWYMKRHIDYSRQQISLFWKNLSVSEARGKILHY
QVTLQELTGGKAMTQNITGHTSWTTVIPRTGNWAVAVSAANSKGSSLPTRINIMNLCEAG
LLAPRQVSANSEGMDNILVTWQPPRKDPSAVQEYVVEWRELHPGGDTQVPLNWLRSRPYN
VSALISENIKSYICYEIRVYALSGDQGGCSSILGNSKHKAPLSGPHINAITEEKGSILIS
WNSIPVQEQMGCLLHYRIYWKERDSNSQPQLCEIPYRVSQNSHPINSLQPRVTYVLWMTA
*LTAAGESSHGNEREFCLQGKANWMAFVAPSICIAIIMVGIFST***HYFQQKVFVLLAALRPQ**
WCSREIPDPANSTCAKKYPIAEEKTQLPLDRLLIDWPTPEDPEPLVISEVLHQVTPVF
RH
PPCSNWPQREKGIQGHQASEKDMMHSASSPPPPRALQAESRQLVDLYKVLESRGS
DPKPE
NPACPWTVLPAGDLPTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLH
PL
TFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML

Жирный шрифт указывает на пропептид, курсив с подчеркиванием указывает на внеклеточный домен, курсив указывает на трансмембранный домен, и жирный шрифт с подчеркиванием указывает на цитоплазматический домен.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит внеклеточный домен IL-12Rβ1 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые

сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью IL-12Rβ1 человека, с одной - четырьмя аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью IL-12Rβ1 человека, с одной или двумя аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-237 IL-12Rβ1 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 5 или ее фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент предусматривает IL-12Rβ1 под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5, с одной - четырьмя аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5, с одной или двумя аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-545 IL-12Rβ1 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 6 или ее фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент предусматривает IL-12Rβ1 под SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6, с одной - четырьмя аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6, с одной или двумя аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит внеклеточный домен IL-12Rβ2 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12. В некоторых

вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью IL-12Rβ2 человека, с одной - четырьмя аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью IL-12Rβ2 человека, с одной или двумя аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-212 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 7, с одной - четырьмя аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 7, с одной или двумя аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-222 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8, с одной - четырьмя аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8, с одной или двумя аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность,

характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 9, с одной - четырьмя аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 9, с одной или двумя аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 9 с одной или более заменами цистеина. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 9 с аминокислотной заменой в положении C242. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в положении C242 и представляет собой C242S. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-622 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10, с одной - четырьмя аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10, с одной или двумя аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-227 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 11, с одной -

четырьмя аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 11, с одной или двумя аминокислотными заменами.

1.3 **Линкеры**

В данном документе предусмотрены линкеры для применения в маскированном цитокине или продукте его расщепления. Линкер, предусмотренный в данном документе, относится к пептиду, состоящему из двух или более аминокислот, который применяется для соединения вместе функциональных компонентов в маскированных цитокинах, описанных в данном документе.

Маскированный цитокин содержит первый линкер и второй линкер, где один из первого линкера или второго линкера содержит протеолитически расщепляемый пептид.

В некоторых вариантах осуществления второй линкер содержит протеолитически расщепляемый пептид (линкер, называемый в данном документе «протеолитически расщепляемым линкером»), и первый линкер не содержит протеолитически расщепляемого пептида (линкер, называемый в данном документе «протеолитически нерасщепляемым линкером») таким образом, что первая полипептидная цепь содержит

N’ **HL1-нерасщепляемый L1-MM** C’,

и вторая полипептидная цепь содержит

N’ **HL2-расщепляемый L2-C** C’.

В некоторых вариантах осуществления первый линкер содержит протеолитически расщепляемый пептид (линкер, называемый в данном документе «протеолитически расщепляемым линкером» или «расщепляемым линкером»), и второй линкер не содержит протеолитически расщепляемого пептида (линкер, называемый в данном документе «протеолитически нерасщепляемым линкером» или «нерасщепляемым линкером») таким образом, что первая полипептидная цепь содержит

N’ **HL1-расщепляемый L1-MM** C’

и вторая полипептидная цепь содержит

N’ **HL2-нерасщепляемый L2-C** C’

Нерасщепляемые линкеры и расщепляемые линкеры из некоторых вариантов осуществления более подробно описаны ниже.

1.3.1 **Протеолитически нерасщепляемые линкеры**

В некоторых вариантах осуществления длина нерасщепляемого линкера составляет 3-18 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления длина нерасщепляемого линкера составляет 3-15 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер характеризуется высоким содержанием аминокислотных остатков G и S.

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит только типы аминокислотных остатков, выбранные из группы, состоящей из G и S.

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит [$(G)_nS$], где n равняется 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12 (GGGGS).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13 (GGGGSGGGGS).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14 (GGSGGGSGGGGGS).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 54 (GGSGGSGGSGGSGGSSGP).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 55 (PGGSGP).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 56 (GGSPG).

В некоторых вариантах осуществления, где второй линкер содержит протеолитически расщепляемый пептид таким образом, что второй линкер представляет собой протеолитически расщепляемый линкер, и первый линкер не содержит протеолитически расщепляемого пептида таким образом, что первый линкер представляет собой протеолитически нерасщепляемый линкер, длина нерасщепляемого линкера составляет 3-18 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12 (GGGGS). В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13 (GGGGSGGGGS). В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14 (GGSGGGSGGGGGS). В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 54 (GGSGGSGGSGGSGGSSGP). В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 55 (PGGSGP). В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 56 (GGSPG).

В некоторых вариантах осуществления необходимо, чтобы первая и вторая полипептидные цепи имели одинаковую или сходную длину для обеспечения ассоциации первого домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни, со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и маскирования маскирующим компонентом цитокина IL-12 или его функционального фрагмента в собранной конструкции. Таким образом, в случаях, где маскирующий компонент представляет собой

более короткую аминокислотную последовательность, чем цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, разница в длине может компенсироваться полностью или частично посредством применения более длинного линкера L1.

1.3.2 **Протеолитически расщепляемые линкеры**

В некоторых вариантах осуществления длина расщепляемого линкера составляет 10-25 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит протеолитически расщепляемый пептид (CP), фланкированный с обеих сторон спейсерным доменом (SD), как показано ниже:

SD-CP-SD

Расщепляемые пептиды

Расщепляемый линкер содержит расщепляемый пептид.

Расщепляемый пептид представляет собой полипептид, который содержит сайт расщепления протеазой таким образом, что расщепляемый пептид является протеолитически расщепляемым. Протеазы представляют собой ферменты, которые расщепляют и гидролизуют пептидные связи между двумя конкретными аминокислотными остатками целевых белков субстрата. Используемый в данном документе термин «сайт расщепления» относится к распознаваемому сайту для расщепления части расщепляемого пептида, находящемуся в любом из линкеров, которые содержат расщепляемый пептид, описанный в данном документе. Таким образом, сайт расщепления может находиться в последовательности расщепляемого пептида, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления представляет собой аминокислотную последовательность, которая распознается и расщепляется расщепляющим средством.

В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления протеазой представляет собой опухоль-ассоциированный сайт расщепления протеазой. «Опухоль-ассоциированный сайт расщепления протеазой», предусмотренный в данном документе, представляет собой аминокислотную последовательность, распознаваемую протеазой, экспрессия которой является специфической или повышенной для опухолевой клетки или окружения опухолевых клеток.

Окружение опухолевых клеток является сложным и может содержать множество разных протеаз. Таким образом, конкретный сайт, в котором указанный расщепляемый пептид будет расщепляться в окружении опухолевых клеток, может варьировать между типами опухоли, между пациентами с одним и тем же типом опухоли и даже между продуктами расщепления, образующимися в одной и той же опухоли, в зависимости от конкретного окружения опухолевых клеток. Более того, даже после расщепления дополнительная модификация исходного продукта расщепления, например, посредством удаления одной или двух концевых аминокислот, может осуществляться посредством дополнительного действия протеаз в окружении опухолевых клеток. Таким образом, после введения одной структуры маскированного цитокина, описанного в данном документе, может ожидаться образование распределения продуктов расщепления в окружении

опухолевых клеток пациента.

Будет понятно, что сайт расщепления, упоминаемый в данном документе, относится к сайту между двумя конкретными аминокислотными остатками в пределах расщепляемого пептида, которые являются мишенью для протеазы, заведомо ассоциированной с окружением опухолевых клеток. В данном смысле в расщепляемом пептиде, описанном в данном документе, может присутствовать более чем один сайт расщепления, где разные протеазы расщепляют расщепляемый пептид в разных сайтах расщепления. Также возможно, что более чем одна протеаза может воздействовать на один и тот же сайт расщепления в пределах расщепляемого пептида. Описание сайтов расщепления протеазой можно найти в уровне техники.

Таким образом, расщепляемые пептиды, раскрытые в данном документе, могут расщепляться одной или более протеазами.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид представляет собой субстрат для протеазы, который локализуется вместе с ней в области или ткани, в которых экспрессируется рецептор цитокина IL-12.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид представляет собой 5-мер (т. е. пептид длиной 5 аминокислот), 6-мер (т. е. пептид длиной 6 аминокислот), 7-мер (т. е. пептид длиной 7 аминокислот), 8-мер (т. е. пептид длиной 8 аминокислот), 9-мер (т. е. пептид длиной 9 аминокислот), 10-мер (т. е. пептид длиной 10 аминокислот), 11-мер (т. е. пептид длиной 11 аминокислот), 12-мер (т. е. пептид длиной 12 аминокислот), 13-мер (т. е. пептид длиной 13 аминокислот), 14-мер (т. е. пептид длиной 14 аминокислот), 15-мер (т. е. пептид длиной 15 аминокислот), 16-мер (т. е. пептид длиной 16 аминокислот), 17-мер (т. е. пептид длиной 17 аминокислот) или 18-мер (т. е. пептид длиной 18 аминокислот).

В некоторых вариантах осуществления длина расщепляемого пептида составляет 5-18 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина расщепляемого пептида составляет 6-10 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид в пределах расщепляемого линкера содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

Последовательность (* обозначает сайт расщепления в пределах расщепляемого пептида)
MPYD*LYHP
DSGG*FMLT
HEQ*LTV
RAAA*VKSP
VPLS*LY
ISSGLL*SGRS
DLLA*VVAAS

Исключительно в качестве примера, в вышеуказанной таблице * обозначает известный или установленный в результате эксперимента сайт расщепления протеазой в пределах расщепляемого пептида.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15. (VPLS*LY), например, расщепляемый пептид может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 210 (VPLSLYSG). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41. (MPYD*LYHP). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42. (DSGG*FMLT). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43. (RAAA*VKSP). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44. (ISSGLL*SGRS), например, расщепляемый пептид может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 211 (ISSGLLSGRSDQP). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45. (DLLA*VVAAS).

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 15. (VPLS*LY). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 210 (VPLSLYSG). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 41. (MPYD*LYHP). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 42. (DSGG*FMLT). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 43. (RAAA*VKSP). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 44. (ISSGLL*SGRS). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 211 (ISSGLLSGRSDQP). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 45. (DLLA*VVAAS).

Было обнаружено, что расщепляемые пептиды, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 44 или 45, демонстрируют высокую степень специфичности расщепления в окружении опухолевых клеток по сравнению с окружением неопухолевых клеток. Таким образом, если данные расщепляемые пептиды включены в маскированный цитокин IL-12, раскрытый в любой части данного документа, любые системные побочные эффекты вводимого цитокина IL-12 или его функционального фрагмента могут дополнительно снижаться.

Спейсерные домены

Спейсерный домен может состоять из одной или более аминокислот. Функция спейсерных доменов, при их наличии, состоит в соединении протеолитически расщепляемого пептида (CP) с другими функциональными компонентами в конструкциях, описанных в данном документе.

Будет понятно, что спейсерные домены не изменяют биологическое взаимодействие протеолитически расщепляемого пептида с протеазами в окружении опухолевых клеток или окружении неопухолевых клеток. Иными словами, даже при наличии спейсерных доменов протеолитически расщепляемые пептиды по настоящему изобретению, раскрытые в данном документе, сохраняют свою предпочтительную специфичность в отношении опухоли.

В некоторых вариантах осуществления спейсерные домены, фланкирующие протеолитически расщепляемый пептид, являются разными.

В некоторых вариантах осуществления спейсерные домены характеризуются высоким содержанием аминокислотных остатков G, S и P.

В некоторых вариантах осуществления спейсерные домены содержат только типы аминокислотных остатков, выбранные из группы, состоящей из G, S и P.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит

N' **SD1-CP-SD2** C',

где SD1 представляет собой первый спейсерный домен, и SD2 представляет собой второй спейсерный домен.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит

N' **SD1-CP-SD2** C',

В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит

N' **HL1-нерасщепляемый L1-MM** C',

и вторая полипептидная цепь содержит

N' **HL2-SD1-CP-SD2 -C** C'

В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит

N' **HL1-SD1-CP-SD2 -MM** C',

и вторая полипептидная цепь содержит

N' **HL2-нерасщепляемый L2-C** C'

В некоторых вариантах осуществления N-конец SD1 представляет собой глицин (G).

В некоторых вариантах осуществления длина первого спейсерного домена (SD1) составляет 3-10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина первого спейсерного домена (SD1) составляет 5-9 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления SD1 содержит SEQ ID NO: 16 (GGSGGS).

В некоторых вариантах осуществления SD1 содержит SEQ ID NO: 17 (GGSGGSGGS).

В некоторых вариантах осуществления C-концевая последовательность SD2 представляет собой **-GP** C'.

В некоторых вариантах осуществления длина второго спейсерного домена (SD2)

составляет 3-6 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления SD2 содержит SEQ ID NO: 18 (SGP).

Иллюстративные комбинации SD1 и SD2 в расщепляемом линкере показаны ниже.

Структура линкера	Последовательность SD1	Последовательность SD2
SD1-CP-SD2	GGSGGS	SGP
SD1-CP-SD2	GGSGGSGGS	SGP

В некоторых вариантах осуществления протеолитически расщепляемый линкер содержит SD1-CP-SD2, где SD1 представляет собой первый спейсерный домен, CP представляет собой расщепляемый пептид, и SD2 представляет собой второй спейсерный домен, и где CP характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления спейсерные домены характеризуются высоким содержанием аминокислотных остатков G, S и P. В некоторых вариантах осуществления спейсерные домены содержат только типы аминокислотных остатков, выбранные из группы, состоящей из G, S и P.

В некоторых вариантах осуществления протеолитически расщепляемый линкер содержит SD1-CP-SD2, где SD1 представляет собой первый спейсерный домен, CP представляет собой расщепляемый пептид, и SD2 представляет собой второй спейсерный домен, и где CP характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления спейсерные домены характеризуются высоким содержанием аминокислотных остатков G, S и P. В некоторых вариантах осуществления спейсерные домены содержат только типы аминокислотных остатков, выбранные из группы, состоящей из G, S и P.

В некоторых вариантах осуществления протеолитически расщепляемый линкер содержит SD1-CP-SD2, где SD1 представляет собой первый спейсерный домен, CP представляет собой расщепляемый пептид, и SD2 представляет собой второй спейсерный домен, и где CP характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 44, и SD2 характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления длина SD1 составляет 3-6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления спейсерные домены характеризуются высоким содержанием аминокислотных остатков G, S и P. В некоторых вариантах осуществления спейсерные домены содержат только типы аминокислотных остатков, выбранные из группы, состоящей из G, S и P.

В некоторых вариантах осуществления протеолитически расщепляемый линкер содержит SD1-CP-SD2, где SD1 представляет собой первый спейсерный домен, CP представляет собой расщепляемый пептид, и SD2 представляет собой второй спейсерный домен, и где CP характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 45, и SD2 характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления длина SD1 составляет 3-6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, где спейсерные

домены характеризуются высоким содержанием аминокислотных остатков G, S и P. В некоторых вариантах осуществления спейсерные домены содержат только типы аминокислотных остатков, выбранные из группы, состоящей из G, S и P.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 19 (GGSGGS**VPLSLY**SGP).

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 20 (GGSGGSGGS**VPLSLY**SGP).

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 46 (GGSGGS**MPYDLYHP**SGP).

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 47 (GGSGGSGGS**MPYDLYHP**SGP).

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 48 (GGSGGS**DSGGFMLT**SGP).

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 49 (GGSGGSGGS**DSGGFMLT**SGP).

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 50 (GGSGGS**RAAAVKSP**SGP).

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 51 (GGSGGSGGS**RAAAVKSP**SGP).

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 52 (GGSGGS**ISSGLLSGRS**SGP).

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 53 (GGSGGSGGS**ISSGLLSGRS**SGP).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12 (GGGGS), и расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 19 (GGSGGS**VPLSLY**SGP).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13 (GGGGSGGGGS), и расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 19 (GGSGGS**VPLSLY**SGP).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14 (GGSGGGSGGGGS), и расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 19 (GGSGGS**VPLSLY**SGP).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12 (GGGGS), и расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 20 (GGSGGSGGS**VPLSLY**SGP).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13 (GGGGSGGGGS), и расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 20

(GGSGGSGGS**VPLSLY**SGP).

В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14 (GGSGGGSGGGGGS), и расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 20 (GGSGGSGGS**VPLSLY**SGP).

В некоторых вариантах осуществления, где второй линкер содержит протеолитически расщепляемый пептид таким образом, что второй линкер представляет собой протеолитически расщепляемый линкер, и первый линкер не содержит протеолитически расщепляемого пептида таким образом, что первый линкер представляет собой протеолитически нерасщепляемый линкер, расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 46, и нерасщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 55.В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность под SEQ ID NO: 47, и нерасщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 55.В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность под SEQ ID NO: 48, и нерасщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 55.В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность под SEQ ID NO: 49, и нерасщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 56.В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность под SEQ ID NO: 50, и нерасщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 55.В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность под SEQ ID NO: 50, и нерасщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 14.В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность под SEQ ID NO: 51, и нерасщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 56.В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность под SEQ ID NO: 51, и нерасщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 14.В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность под SEQ ID NO: 52, и нерасщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 55.В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность под SEQ ID NO: 52, и нерасщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 14.В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность под SEQ ID NO: 53, и нерасщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 56.В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность под SEQ ID NO: 53, и нерасщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления протеолитически расщепляемый линкер содержит расщепляемый пептид, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 44 (ISSGLL*SGRS).

В некоторых вариантах осуществления протеолитически расщепляемый линкер содержит расщепляемый пептид, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 45 (DLLA*VVAAS).

Комбинации линкеров, раскрытые в данном документе и раскрытые в

иллюстративных молекулах АК, могут применяться с любым цитокином IL-12 или его фрагментом, раскрытыми в данном документе. Комбинации линкеров, раскрытые в данном документе и раскрытые в иллюстративных молекулах АК, могут применяться с любым маскирующим компонентом, раскрытым в данном документе. Комбинации линкеров, раскрытые в данном документе и раскрытые в иллюстративных молекулах АК, могут применяться с любыми доменами, обеспечивающими увеличение периода полужизни. Иными словами, линкеры, раскрытые в иллюстративных молекулах АК, могут применяться в комбинациях с любым цитокином IL-12 или его фрагментом, раскрытыми в данном документе, маскирующим компонентом, раскрытым в данном документе, и/или доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, раскрытым в данном документе.

1.4 **Домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни**

В данном документе предусмотрены домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни, для применения в маскированном цитокине или продукте его расщепления. Длинный период полужизни in vivo является важным для терапевтических белков. К сожалению, цитокины, которые вводятся субъекту, обычно характеризуются коротким периодом полужизни, поскольку в норме они быстро выводятся из организма субъекта посредством механизмов, включающих выведение почкой и разрушение путем эндоцитоза. Таким образом, в маскированном цитокине, предусмотренном в данном документе, домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, соединен с маскированным цитокином с целью увеличения периода полужизни цитокина in vivo.

Термин «домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни» относится к домену, который увеличивает период полужизни целевого компонента в сыворотке крови. Термин «домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни» охватывает, например, антитела и фрагменты антител.

Маскированный цитокин, предусмотренный в данном документе, содержит первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, который ассоциирован со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни.

В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, ассоциированы нековалентно.

В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, связаны ковалентно.

В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, соединен со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, посредством одной или более дисульфидных связей.

В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, соединен со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, посредством линкера домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни (HLDL).

В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, ассоциированы нековалентно и, более того, первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, соединен со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, посредством дисульфидной связи.

В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит первое антитело или его фрагмент, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит второе антитело или его фрагмент.

Антитело или его фрагмент, которые обладают способностью к FcRn-опосредованной рециркуляции, могут снижать или иным способом замедлять выведение маскированного цитокина из организма субъекта, тем самым увеличивая продолжительность периода полужизни введенного маскированного цитокина. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляют собой любое антитело или его фрагмент, которые обладают способностью к FcRn-опосредованной рециркуляции, такие как любой полипептид тяжелой цепи или его часть (например, Fc-домен или его фрагмент), которые обладают способностью к FcRn-опосредованной рециркуляции.

Антитело или его фрагмент могут представлять собой любое антитело или его фрагмент. Однако в некоторых вариантах осуществления маскированного цитокина, содержащего первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, либо первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, либо второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, может содержать антитело или его фрагмент, которые не связываются с рецептором FcRn, например, полипептид легкой цепи. Например, в некоторых вариантах осуществления маскированного цитокина первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит антитело или его фрагмент, которые содержат полипептид легкой цепи или его часть, которые непосредственно не взаимодействуют с рецептором FcRn, но маскированный цитокин тем не менее характеризуется увеличенным периодом полужизни вследствие содержания второго домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни, который способен взаимодействовать с рецептором FcRn, например, за счет содержания полипептида тяжелой цепи. В уровне техники установлено, что для FcRn-опосредованной рециркуляции требуется связывание рецептора FcRn с Fc-областью антитела или его фрагмента. Например, в ходе исследований было показано, что остатки I253, S254, H435 и Y436 (нумерация в соответствии с EU-индексом по Kabat) являются важными для взаимодействия Fc-области человека и комплекса FcRn человека. См., например, Firan, M., et al., Int. Immunol. 13 (2001) 993-1002; Shields, R.L., et al, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604). Также были изучены и описаны различные мутантные варианты по остаткам 248-259, 301-317, 376-382 и 424-437 (нумерация в соответствии с EU-индексом по Kabat). Yeung,

Y.A., et al. (J. Immunol. 182 (2009) 7667-7671.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент предусматривают либо полипептид тяжелой цепи, либо полипептид легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент предусматривают часть либо полипептида тяжелой цепи, либо полипептида легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент предусматривают Fc-домен или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент предусматривают CH2- и CH3-домен или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент предусматривают константный домен полипептида тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент предусматривают константный домен полипептида легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент предусматривают полипептид тяжелой цепи или его фрагмент (например, Fc-домен или его фрагмент). В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент предусматривают полипептид легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит первый Fc-домен или его фрагмент, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит второй Fc-домен или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и/или второго Fc-доменов предусматривает наличие одной или более модификаций, которые способствуют нековалентной ассоциации первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни. В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит Fc-домен IgG1 или его фрагмент, предусматривающие наличие мутаций Y349C; T366S; L38A и Y407V, которые обеспечивают образование «впадины» в первом домене, обеспечивающем увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит Fc-домен IgG1 или его фрагмент, предусматривающие наличие мутаций S354C и T366W, которые обеспечивают образование «выступа» во втором домене, обеспечивающем увеличение периода полужизни.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, представляет собой Fc-домен IgG1, IgG2 или IgG4 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, представляет собой Fc-домен IgG1 или его фрагмент. Константная область тяжелой цепи гамма 1 иммуноглобулина IgG1 человека характеризуется последовательностью:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC**DKTHTCPPCPAPELLG**
G
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYN

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 21)

В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни, получают из последовательности константной области тяжелой цепи гамма 1 иммуноглобулина IgG1 человека под SEQ ID NO: 21 («исходной последовательности») таким образом, что каждый из первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, содержат SEQ ID NO: 21 или ее фрагмент с одной или более аминокислотными модификациями.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, содержит часть SEQ ID NO: 21, показанную жирным шрифтом выше, необязательно с одной или более аминокислотными модификациями, т. е.
DKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY N
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR W
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 22)

В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни, содержат SEQ ID NO: 22 с аминокислотными заменами, способствующими ассоциации первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, в соответствии с подходом «выступ-во-впадину».В некоторых вариантах осуществления последовательность SEQ ID NO: 22 содержит мутации Y349C; T366S; L38A и Y407V (пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU по Kabat), обеспечивающие образование «впадины» в первом домене, обеспечивающем увеличение периода полужизни, и мутации S354C и T366W (пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU по Kabat), обеспечивающие образование «выступа» во втором домене, обеспечивающем увеличение периода полужизни. Эти модифицированные последовательности представлены под SEQ ID NO: 23 и 24 и показаны ниже.

Первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни (Y349C; T366S; L38A и Y407V), SEQ ID NO: 23:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE

DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ
VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни (S354C и T366W), SEQ ID NO: 24:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK
NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, дополнительно содержит аминокислотную замену N297A, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU по Kabat.

Первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), SEQ ID NO: 25:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ
VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни (S354C, T366W и N297A), SEQ ID NO: 26:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK
NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, дополнительно содержит аминокислотную замену I253A, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU по Kabat.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, дополнительно содержит обе из аминокислотных замен N297A и I253A, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU по Kabat.

Первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A), SEQ ID NO: 27:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDP

EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни (S354C, T366W, N297A и I253A), SEQ ID NO: 28:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из аминокислотных последовательностей под любым из SEQ ID NO: 22, 23, 25 и 27.

В некоторых вариантах осуществления второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из аминокислотных последовательностей под любым из SEQ ID NO: 22, 24, 26 и 28.

В некоторых вариантах осуществления первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит аминокислотную последовательность, предусматривающую наличие одной или более модификаций, например, одной или более аминокислотных замен, добавлений или делеций, по сравнению с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 22, 23, 25 и 27. В некоторых вариантах осуществления второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит аминокислотную последовательность, предусматривающую наличие одной или более модификаций, например, одной или более аминокислотных замен, добавлений или делеций, по сравнению с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 22, 24, 26 и 28. Одна или более модификаций могут представлять собой любые модификации или изменения, описанные в данном документе, в том числе в некоторых вариантах осуществления любые модификации или изменения, раскрытые в данном документе, которые способствуют гетеродимеризации полипептидных цепей и/или подавляют гетеродимеризацию полипептидных цепей, изменяют эффекторную функцию или усиливают эффекторную функцию.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен или его фрагмент содержат одну или более аминокислотных замен, обеспечивающих изменение эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, представляет собой Fc-домен IgG1 или его фрагмент и содержит одну или более

аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из N297A, N297G, N297Q, L234A, L235A, C220S, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, D265A и P329G, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU по Kabat. В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, представляет собой Fc-домен IgG2 или его фрагмент и содержит аминокислотную(аминокислотные) замену(замены) V234A и G237A; H268Q, V309L, A330S, и A331S; и/или V234A, G237A, P238S, H268A, V309L и A330S, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU по Kabat. В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, представляет собой Fc-домен IgG2 или его фрагмент и содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, A331S, P238S, H268A и V309L, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU по Kabat. В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, представляет собой Fc-домен IgG4 или его фрагмент и содержит аминокислотную(аминокислотные) замену(замены) L235A, G237A и E318A; S228P, L234A и L235A; H268Q, V309L, A330S и P331S; и/или S228P и L235A, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU по Kabat. В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, представляет собой Fc-домен IgG2 или его фрагмент и содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из L235A, G237A, E318A, S228P, L234A, H268Q, V309L, A330S и P331S, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU по Kabat.

В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит Fc-домен или его фрагмент, которые содержат одну или более аминокислотных замен, обеспечивающих усиление эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, представляет собой Fc-домен IgG1 или его фрагмент и содержит аминокислотную(аминокислотные) замену(замены) S298A, E333A и K334A; S239D и I332E; S239D, A330L и I332E; P247I и A339D или A339Q; D280H и K290S; D280H, K290S и либо S298D, либо S298V; F243L, R292P и Y300L; F243L, R292P, Y300L и P396L; F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L; G236A, S239D и I332E; K326A и E333A; K326W и E333S; K290E, S298G и T299A; K290E, S298G, T299A и K326E; K290N, S298G и T299A; K290N, S298G, T299A и K326E; K334V; L235S, S239D и K334V; K334V и Q331M, S239D, F243V, E294L или S298T; E233L, Q311M и K334V; L234I, Q311M и K334V; K334V и S298T, A330M или A330F; K334V, Q311M и либо A330M, либо A330F; K334V, S298T и либо A330M, либо A330F; K334V, S239D и либо A330M, либо S298T; L234Y, Y296W и K290Y, F243V или E294L; Y296W и либо L234Y, либо K290Y; S239D, A330S и I332E, V264I; F243L и V264I; L328M; I332E; L328M и I332E; V264I и I332E; S239E и I332E; S239Q и I332E; S239E; A330Y; I332D; L328I и I332E; L328Q и I332E; V264T; V240I; V266I; S239D; S239D и I332D; S239D и I332N; S239D и I332Q; S239E и I332D; S239E и I332N; S239E и I332Q; S239N и I332D; S239N и I332E; S239Q и I332D; A330Y и I332E; V264I, A330Y и I332E; A330L и

I332E; V264I, A330L и I332E; L234E, L234Y или L234I; L235D, L235S, L235Y или L235I; S239T; V240M; V264Y; A330I; N325T; I332E и L328D, L328V, L328T или L328I; V264I, I332E и либо S239E, либо S239Q; S239E, V264I, A330Y и I332E; A330Y, I332E и либо S239D, либо S239N; A330L, I332E и либо S239D, либо S239N; V264I, S298A и I332E; S298A, I332E и либо S239D, либо S239N; S239D, V264I и I332E; S239D, V264I, S298A и I332E; S239D, V264I, A330L и I332E; S239D, I332E и A330I; P230A; P230A, E233D и I332E; E272Y; K274T, K274E, K274R, K274L или K274Y; F275W; N276L; Y278T; V302I; E318R; S324D, S324I или S324V; K326I или K326T; T335D, T335R или T335Y; V240I и V266I; S239D, A330Y, I332E и L234I; S239D, A330Y, I332E и L235D; S239D, A330Y, I332E и V240I; S239D, A330Y, I332E и V264T; и/или S239D, A330Y, I332E и либо K326E, либо K326T, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU по Kabat. В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, представляет собой Fc-домен IgG1 или его фрагмент и содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из P230A, E233D, L234E, L234Y, L234I, L235D, L235S, L235Y, L235I, S239D, S239E, S239N, S239Q, S239T, V240I, V240M, F243L, V264I, V264T, V264Y, V266I, E272Y, K274T, K274E, K274R, K274L, K274Y, F275W, N276L, Y278T, V302I, E318R, S324D, S324I, S324V, N325T, K326I, K326T, L328M, L328I, L328Q, L328D, L328V, L328T, A330Y, A330L, A330I, I332D, I332E, I332N, I332Q, T335D, T335R и T335Y.

В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит одну или более аминокислотных замен, которые обеспечивают усиление связывания домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни, с FcRn. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен обеспечивают повышение аффинности связывания Fc-содержащего полипептида (например, полипептида тяжелой цепи или Fc-домена или его фрагмента) с FcRn при кислом значении pH. В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из M428F; T250Q и M428F; M252Y, S254T и T256E; P257I и N434H; D376V и N434H; P257I и Q3111; N434A; N434W; M428F и N434S; V259I и V308F; M252Y, S254T и T256E; V259I, V308F и M428F; T307Q и N434A; T307Q и N434S; T307Q, E380A и N434A; V308P и N434A; N434H и V308P.

Для целей изготовления, для улучшения секреции белка выше домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни, может быть сконструирован сигнальный пептид. Сигнальный пептид выбирают в соответствии с требованиями для линии клеток, известными из уровня техники. Понятно, что сигнальный пептид не экспрессируется в качестве части белка, который будет подвергаться очистке и составлению в качестве лекарственного препарата.

1.4.1 **Модификации, способствующие гетеродимеризации**

Домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни, описанные в данном документе, могут включать одну или более модификаций, которые способствуют

гетеродимеризации двух разных доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни. В некоторых вариантах осуществления необходимым является способствовать гетеродимеризации первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, таким образом, чтобы получение маскированного цитокина в его правильной гетеродимерной форме осуществлялось эффективно. Таким образом, одна или более аминокислотных модификаций могут осуществляться в отношении первого домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни, и одна или более аминокислотных модификаций могут осуществляться в отношении второго домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни, с применением любой стратегии, доступной из уровня техники, в том числе любой стратегии, описанной в Klein et al. (2012), MAbs, 4(6): 653-663. Иллюстративные стратегии и модификации подробно описаны ниже.

Подход «выступы-во-впадины»

Одна стратегия для способствования гетеродимеризации двух разных доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, представляет собой подход, обозначаемый термином «выступы-во-впадины».

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, каждый из которых содержит CH3-домен. В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержащий CH3-домен, представляет собой полипептид тяжелой цепи или его фрагмент (например, Fc-домен или его фрагмент). CH3-домены двух доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, можно изменять с помощью технологии «выступы-во-впадины», которая подробно описана с несколькими примерами, например, в WO 1996/027011; Ridgway, J.B. et al, Protein Eng. (1996) 9(7): 617-621; Merchant, A.M., et al, Nat. Biotechnol. (1998) 16(7): 677-681. См. также Klein et al. (2012), MAbs, 4(6): 653-663. С применением способа «выступ-во-впадины» поверхности взаимодействия двух CH3-доменов изменяют для повышения степени гетеродимеризации двух доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, содержащих два измененных CH3-домена. Это происходит посредством введения объемного остатка в CH3-домен одного из доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни, который действует в качестве «выступа». Затем для обеспечения места для расположения объемного остатка в другом домене, обеспечивающем увеличение периода полужизни, образуется «впадина», в которой можно разместить выступ. Любой из измененных CH3-доменов может являться «выступом», в то время как другой может являться «впадиной». Введение дисульфидного мостика дополнительно стабилизирует гетеродимеры (Merchant, A.M., et al, Nat. Biotechnol. (1998) 16(7); Atwell, S., et al, J. Mol. Biol. (1997) 270(1): 26-35), а также повышает выход.

Сообщалось, что значения выхода гетеродимеризации выше 97% могут достигаться посредством введения мутаций S354C и T366W в тяжелую цепь с получением «выступа» и посредством введения мутаций Y349C, T366S, L368A и Y407V в тяжелую цепь с получением «впадины» (нумерация остатков в соответствии с системой нумерации EU по

Kabat). Carter et al. (2001), J. Immunol. Methods, 248: 7-15; Klein et al. (2012), MAbs, 4(6): 653-663.

В некоторых вариантах осуществления, предусматривающих первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит полипептид тяжелой цепи или его часть (например, Fc-домен или его фрагмент), которые содержат аминокислотные мутации S354C и T366W (пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU по Kabat), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит полипептид тяжелой цепи или его часть (например, Fc-домен или его фрагмент), которые содержат аминокислотные мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V (пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU по Kabat). В некоторых вариантах осуществления, предусматривающих первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит полипептид тяжелой цепи или его часть (например, Fc-домен или его фрагмент), которые содержат аминокислотные мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V (пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU по Kabat), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит полипептид тяжелой цепи или его часть (например, Fc-домен или его фрагмент), которые содержат аминокислотные мутации S354C и T366W (пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU по Kabat).

Дополнительные примеры замен, которые можно осуществлять для образования выступов и впадин, включают таковые, описанные в US20140302037A1, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Например, в некоторых вариантах осуществления любые из следующих аминокислотных замен можно осуществлять в отношении первого домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни («первого домена»), и спаренного второго домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни («второго домена»), каждый из которых содержит Fc-домен: (a) Y407T в первом домене и T366Y во втором домене; (b) Y407A в первом домене и T366W во втором домене; (c) F405A в первом домене и T394W во втором домене; (d) F405W в первом домене и T394S во втором домене; (e) Y407T в первом домене и T366Y во втором домене; (f) T366Y и F405A в первом домене и T394W и Y407T во втором домене; (g) T366W и F405W в первом домене и T394S и Y407A во втором домене; (h) F405W и Y407A в первом домене и T366W и T394S во втором домене или (i) T366W в первом домене и T366S, L368A и Y407V во втором домене, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU по Kabat.

В некоторых вариантах осуществления любые из следующих аминокислотных замен можно осуществлять в отношении первого домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни («первого домена»), и спаренного второго домена, обеспечивающего увеличение периода полужизни («второго домена»), каждый из которых содержит Fc-

домен: (a) Y407T во втором домене и T366Y в первом домене; (b) Y407A во втором домене и T366W в первом домене; (c) F405A во втором домене и T394W в первом домене; (d) F405W во втором домене и T394S в первом домене; (e) Y407T во втором домене и T366Y в первом домене; (f) T366Y и F405A во втором домене и T394W и Y407T в первом домене; (g) T366W и F405W во втором домене и T394S и Y407A в первом домене; (h) F405W и Y407A во втором домене и T366W и T394S в первом домене или (i) T366W во втором домене и T366S, L368A и Y407V в первом домене, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU по Kabat.

В вариантах осуществления, предусматривающих первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, каждый из которых содержит Fc-домен, любые из гетеродимеризующих изменений, описанных в данном документе, могут применяться в Fc-доменах для способствования гетеродимеризации любого из маскированных цитокинов, описанных в данном документе.

1.5 Иллюстративные маскированные цитокины

В маскированных цитокинах по настоящему изобретению можно комбинировать цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, описанные в любой части данного документа; маскирующий компонент, описанный в любой части данного документа; первый и второй домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни, описанные в любой части данного документа, и расщепляемые и нерасщепляемые линкеры, описанные в любой части данного документа.

Кроме того, в варианте осуществления любая конкретная последовательность, раскрытая в данном документе, может необязательно содержать дополнительные аминокислотные замены, например, одну, две или три замены. В другом варианте осуществления последовательности, характеризующиеся по меньшей мере 90%, предпочтительно 95%, более предпочтительно 99% гомологией по отношению к любой конкретной последовательности, раскрытой в данном документе для домена маскированных цитокинов, также охватываются настоящим изобретением.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит IL-12Rβ1 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-237 IL-12Rβ1 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 5 или ее фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12, и первый домен, обеспечивающий

увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-545 IL-12Rβ1 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 6 или ее фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит IL-12Rβ2 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61, маскирующий компонент содержит IL-12Rβ2 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62, маскирующий компонент содержит IL-12Rβ2 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63, маскирующий компонент содержит IL-12Rβ2 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный

фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит последовательность под SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит IL-12Rβ2 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-212 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 7, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-222 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 8, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 9, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно

последовательность под SEQ ID NO: 65, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, и домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-622 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 10, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-227 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 11, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит IL-12Rβ1 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 27 (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 28 (S354C, T366W, N297A и I253A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-237 IL-12Rβ1 человека, а именно последовательность под

SEQ ID NO: 5 или ее фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 27 (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 28 (S354C, T366W, N297A и I253A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-545 IL-12Rβ1 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 6 или ее фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 27 (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 28 (S354C, T366W, N297A и I253A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит IL-12Rβ2 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 27 (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 28 (S354C, T366W, N297A и I253A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-212 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 7, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 27 (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 28 (S354C, T366W, N297A и I253A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-222 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 8, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 27 (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 28 (S354C, T366W, N297A и I253A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 9, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 27 (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 28 (S354C,

T366W, N297A и I253A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-622 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 10, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 27 (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 28 (S354C, T366W, N297A и I253A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, маскирующий компонент содержит остатки 24-227 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 11, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 27 (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 28 (S354C, T366W, N297A и I253A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, и маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 55, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 56, и первый домен,

обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 53, и первый домен, обеспечивающий увеличение

периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 56, расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 53, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 64, маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 65, нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 55, расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

В некоторых вариантах осуществления маскированного цитокина первая полипептидная цепь содержит

N’ **HL1-L1-MM** C’,

и вторая полипептидная цепь содержит

N’ **HL2-L2-[IL-12p35-линкер-IL-12p40]** C’,

где «IL-12p40» представляет собой полипептид IL-12p40 или его функциональный фрагмент, и «IL-12p35» представляет собой полипептид IL-12p35 или его функциональный фрагмент. Первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни (HL1), первый линкер (L1), маскирующий компонент (MM), второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни (HL2), второй линкер (L2) и цитокин IL-12 или его фрагмент ([IL-12p35-линкер-IL-12p40]) могут быть такими, как определено в любой части данного документа.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 81, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 81, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 89.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 83, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 83, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 91.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:

82, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 92.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 83, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 93.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 94.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 84, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 93.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 84, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 94.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 83, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 95.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 83, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 97.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 98.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 84, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 97.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:

84, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 98.

2. ПРОДУКТ РАСЩЕПЛЕНИЯ

В данном документе предусмотрен продукт расщепления «гетеродимерных» маскированных цитокинов IL-12, описанных в данном документе.

Маскированные цитокины IL-12, описанные в данном документе, содержат расщепляемый линкер. После протеолитического расщепления расщепляемого линкера в сайте расщепления образуется продукт расщепления, содержащий цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент. Цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент в продукте расщепления являются активированными, поскольку они больше не являются маскированными маскирующим компонентом. Таким образом, цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент в продукте расщепления способны связываться с целевым белком.

Окружение опухолевых клеток является сложным и может содержать множество разных протеаз. Таким образом, конкретный сайт, в котором указанный расщепляемый пептид в пределах маскированного цитокина IL-12 будет расщепляться в окружении опухолевых клеток, может варьировать между типами опухоли, между пациентами с одним и тем же типом опухоли и даже между продуктами расщепления, образующимися в одной и той же опухоли. Более того, даже после расщепления дополнительная модификация исходного продукта расщепления, например, посредством удаления одной или двух концевых аминокислот, может осуществляться посредством дополнительного действия протеаз в окружении опухолевых клеток. Таким образом, после введения маскированного цитокина, описанного в данном документе, может ожидаться образование распределения продуктов расщепления в окружении опухолевых клеток пациента.

В данном документе предусмотрен продукт расщепления, способный связываться с IL-12R, при этом продукт расщепления содержит цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, получаемые посредством протеолитического расщепления расщепляемого пептида в маскированном цитокине IL-12, как описано в любой части данного документа.

Также в данном документе предусмотрен продукт расщепления маскированного цитокина IL-12, где продукт расщепления способен связываться с IL-12R, при этом продукт расщепления содержит цитокин IL-2 или его функциональный фрагмент, определенные в любой части данного документа. Также в данном документе предусмотрено распределение продуктов расщепления, которые получены или которые можно получить из одной структуры маскированного цитокина IL-12, где каждый продукт расщепления в пределах распределения продуктов расщепления (i) способен связываться с IL-12R и (ii) содержит цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, определенные в любой части данного документа.

Также в данном документе предусмотрен продукт расщепления маскированного цитокина IL-12, где продукт расщепления способен связываться с IL-12R, при этом продукт расщепления содержит полипептид, содержащий

PCP-SD-C,

где PCP представляет собой часть протеолитически расщепляемого пептида; SD представляет собой спейсерный домен, и C представляет собой цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент.

В данном документе дополнительно предусмотрен продукт расщепления маскированного цитокина IL-12, где продукт расщепления способен связываться с IL-12R, при этом продукт расщепления предусматривает гетеродимер белка, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и

вторую полипептидную цепь, содержащую полипептид, характеризующийся формулой 5:

HL2-L2-C

(5),

где HL2 представляет собой второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни; L2 представляет собой нерасщепляемый линкер, и C представляет собой цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, и где первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, ассоциирован со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни. Также в данном документе предусмотрено распределение продуктов расщепления, которые получены или которые можно получить из одной структуры маскированного цитокина IL-12, где каждый продукт расщепления в пределах распределения продуктов расщепления (i) способен связываться с IL-12R и (ii) предусматривает гетеродимер белка, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и

вторую полипептидную цепь, содержащую полипептид, характеризующийся формулой 5:

HL2-L2-C

(5),

где HL2 представляет собой второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни; L2 представляет собой нерасщепляемый линкер, и C представляет собой цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, и где первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, ассоциирован со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни.

В данном документе дополнительно предусмотрен продукт расщепления маскированного цитокина IL-12, где продукт расщепления способен связываться с IL-12R, при этом продукт расщепления предусматривает гетеродимер белка, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую полипептид, содержащий

HL1-SD-PCP,

где HL1 представляет собой первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни; SD представляет собой спейсерный домен, и PCP представляет собой часть

протеолитически расщепляемого пептида, и

вторую полипептидную цепь, содержащую полипептид, содержащий

HL2-L2-C,

где HL2 представляет собой второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни; L2 представляет собой нерасщепляемый линкер, и C представляет собой цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, и

где первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, ассоциирован со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни.

В пределах продукта расщепления маскирующий компонент, домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни, цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, линкеры, спейсерные домены и тип ассоциации между первым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, могут представлять собой любые из таковых, описанных в данном документе, и любую комбинацию таковых, описанных в данном документе.

Местоположение расщепляемого пептида определяет структуру получаемого продукта расщепления, содержащего цитокин IL-12.

Выражение «часть протеолитически расщепляемого пептида» относится к части исходной последовательности протеолитически расщепляемого пептида после осуществления расщепления в сайте расщепления. После расщепления дополнительная модификация исходного продукта расщепления, например, посредством удаления одной или двух концевых аминокислот, может также осуществляться посредством дополнительного действия протеаз в окружении опухолевых клеток. Таким образом, продукты расщепления в пределах распределения продуктов расщепления, которые могут образовываться в окружении опухолевых клеток пациента после введения маскированного цитокина, могут вообще не содержать части протеолитически расщепляемого пептида.

В некоторых вариантах осуществления «часть» относится к 1 аминокислоте, 2 аминокислотам, 3 аминокислотам, 4 аминокислотам, 5 аминокислотам или 6 аминокислотам исходной последовательности протеолитически расщепляемого пептида. В некоторых вариантах осуществления «часть» относится к 2 аминокислотам исходной последовательности протеолитически расщепляемого пептида. В некоторых вариантах осуществления «часть» относится к 3 аминокислотам исходной последовательности протеолитически расщепляемого пептида. В некоторых вариантах осуществления «часть» относится к 4 аминокислотам исходной последовательности протеолитически расщепляемого пептида.

В некоторых вариантах осуществления длина «части» протеолитически расщепляемого пептида составляет 3-6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина «части» протеолитически расщепляемого пептида составляет 3 или 4 аминокислоты.

Сайты расщепления для расщепляемых линкеров, раскрытых в данном документе, раскрыты ниже:

Последовательность (* обозначает сайт расщепления в пределах расщепляемого пептида)
MPYD*LYHP
DSGG*FMLT
HEQ*LTV
RAAA*VKSP
VPLS*LY
ISSGLL*SGRS
DLLA*VVAAS

Исключительно в качестве примера, в вышеуказанной таблице * обозначает известный или установленный в результате эксперимента сайт расщепления протеазой в пределах расщепляемого пептида.

Соответственно, в данном документе раскрыт продукт расщепления любого из маскированных цитокинов, раскрытых в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 68.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 68.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 72.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 72.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 73.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 78.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 78.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 80.

В некоторых вариантах осуществления продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 80.

3. АНАЛИЗЫ СВЯЗЫВАНИЯ

Сила или аффинность взаимодействий при иммунологическом связывании, как, например, между цитокином или его функциональным фрагментом и партнером по связыванию (например, целевым белком, таким как рецептор цитокина), по отношению к которому цитокин или его функциональный фрагмент являются специфичными, могут выражаться в виде константы диссоциации (Kd) взаимодействия, где более низкая Kd соответствует более высокой аффинности. Связывание цитокина IL-12 с рецептором цитокина IL-12 можно выразить посредством Kd. В некоторых вариантах осуществления взаимодействия при иммунологическом связывании происходят между маскированным цитокином (в присутствии или в отсутствие протеазы) и целевым белком, таким как рецептор цитокина. Свойства иммунологического связывания белков могут количественно определяться с применением способов, хорошо известных из уровня техники. Например, один способ включает измерение показателей скорости образования и диссоциации комплекса рецептор цитокина (например, IL-12R)/цитокин (например, IL-12), где данные показатели скорости зависят от показателей концентрации партнеров комплекса, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые в равной степени

влияют на скорость в обоих направлениях. Как «константа скорости ассоциации» (Kon), так и «константа скорости диссоциации» (Koff) могут определяться посредством расчета показателей концентрации и фактических показателей скорости ассоциации и диссоциации. Соотношение Koff/Kon обеспечивает сокращение всех параметров, не относящихся к аффинности, и равняется константе диссоциации Kd. См. Davies et al., Annual Rev Biochem. 59:439-473, (1990).

В некоторых аспектах маскированный цитокин, описанный в данном документе, связывается с целевым белком с приблизительно такой же или более высокой аффинностью после расщепления протеазой по сравнению с исходным цитокином, который содержит маскирующий компонент, но не содержит расщепляемый пептид. Целевой белок может представлять собой любой рецептор цитокина.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин, предусмотренный в данном документе, который не содержит расщепляемого пептида в линкере, характеризуется константой диссоциации (Kd) с целевым белком, составляющей ≤ 1 М, ≤ 150 нМ, ≤ 100 нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 0,1 нМ, ≤ 0,01 нМ или ≤ 0,001 нМ (например, 10-8 М или меньше, например, от 10-8 М до 10-13 М, например, от 10-9 М до 10-13 М). В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин, предусмотренный в данном документе, который содержит расщепляемый пептид в линкере, характеризуется константой диссоциации (Kd) с целевым белком, составляющей ≤1 М, ≤150 нМ, ≤ 100 нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 0,1 нМ, ≤ 0,01 нМ или 0,001 нМ (например, 10-8 М или меньше, например от 10-8 М до 10-13 М, например, от 10-9 М до 10-13 М), до расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин, предусмотренный в данном документе, который содержит расщепляемый пептид в линкере, характеризуется константой диссоциации (Kd) с целевым белком, составляющей ≤ 1 М, ≤ 150 нМ, ≤ 100 нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 0,1 нМ, ≤ 0,01 нМ или ≤ 0,001 нМ (например, 10-8 М или меньше, например, от 10-8 М до 10-13 М, например, от 10-9 М до 10-13 М), после расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления цитокин или его функциональный фрагмент из маскированного цитокина, предусмотренного в данном документе, характеризуются константой диссоциации (Kd) с маскирующим компонентом из маскированного цитокина, составляющей ≥ 500 М, ≥ 250 М, ≥ 200 М, ≥ 150 М, ≥ 100 М, ≥ 50 М, ≥ 10 М, ≥ 1 М, ≥ 500 нМ, ≥ 250 нМ, ≥ 150 нМ, ≥ 100 нМ, ≥ 50 нМ, ≥ 10 нМ, ≥ 1 нМ, ≥ 0,1 нМ, ≥ 0,01 нМ или ≥ 0,001 нМ. В некоторых вариантах осуществления цитокин или его функциональный фрагмент из маскированного цитокина, предусмотренного в данном документе, характеризуются константой диссоциации (Kd), которая составляет от приблизительно 200 М до приблизительно 50 нМ, например, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 175 М, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 150 М, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 125 М, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 100 М, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 75 М, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 50 М, приблизительно или по меньшей мере

приблизительно 25 М, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 5 М, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 1 М, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 750 нМ, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 500 нМ, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 250 нМ, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 150 нМ, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 100 нМ, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 75 нМ или приблизительно или по меньшей мере приблизительно 50 нМ. Анализы для оценки аффинности связывания хорошо известны из уровня техники.

В некоторых аспектах предусмотрены маскированные цитокины, которые демонстрируют необходимый коэффициент окклюзии. Используемый в данном документе термин «коэффициент окклюзии» относится к соотношению (a) максимального выявленного уровня параметра при первой группе условий и (b) минимального выявленного уровня данного параметра при второй группе условий. В контексте маскированного полипептида IL-12 коэффициент окклюзии относится к соотношению (a) максимального выявленного уровня связывания целевого белка (например, белка IL-12R) с маскированным полипептидом IL-12 в присутствии по меньшей мере одной протеазы, способной к расщеплению расщепляемого пептида маскированного полипептида IL-12, и (b) минимального выявленного уровня связывания целевого белка (например, белка IL-12R) с маскированным полипептидом IL-12 в отсутствие протеазы. Таким образом, коэффициент окклюзии для маскированного цитокина можно рассчитать посредством деления EC50 маскированного цитокина до расщепления на EC50 маскированного цитокина после расщепления. Коэффициент окклюзии маскированного цитокина также можно рассчитать в виде соотношения константы диссоциации маскированного цитокина до расщепления протеазой и константы диссоциации маскированного цитокина после расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления более высокий коэффициент окклюзии для маскированного цитокина указывает на то, что связывание целевого белка маскированным цитокином происходит в большей степени (например, происходит преимущественно) в присутствии протеазы, способной к расщеплению расщепляемого пептида маскированного цитокина, чем в отсутствие протеазы.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены маскированные цитокины с оптимальным коэффициентом окклюзии. В некоторых вариантах осуществления оптимальный коэффициент окклюзии маскированного цитокина указывает на то, что маскированный цитокин обладает необходимыми свойствами, применимыми для способов или композиций, предусмотренных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин, предусмотренный в данном документе, демонстрирует оптимальный коэффициент окклюзии, составляющий от приблизительно 2 до приблизительно 10000, например от приблизительно 80 до приблизительно 100. В дополнительном варианте осуществления любого из маскированных цитокинов, предусмотренных в данном документе, коэффициент окклюзии составляет от приблизительно 2 до приблизительно 7500, от приблизительно 2 до

приблизительно 5000, от приблизительно 2 до приблизительно 2500, от приблизительно 2 до приблизительно 2000, от приблизительно 2 до приблизительно 1000, от приблизительно 2 до приблизительно 900, от приблизительно 2 до приблизительно 800, от приблизительно 2 до приблизительно 700, от приблизительно 2 до приблизительно 600, от приблизительно 2 до приблизительно 500, от приблизительно 2 до приблизительно 400, от приблизительно 2 до приблизительно 300, от приблизительно 2 до приблизительно 200, от приблизительно 2 до приблизительно 100, от приблизительно 2 до приблизительно 50, от приблизительно 2 до приблизительно 25, от приблизительно 2 до приблизительно 15, от приблизительно 2 до приблизительно 10, от приблизительно 5 до приблизительно 10, от приблизительно 5 до приблизительно 15, от приблизительно 5 до приблизительно 20, от приблизительно 10 до приблизительно 100, от приблизительно 20 до приблизительно 100, от приблизительно 30 до приблизительно 100, от приблизительно 40 до приблизительно 100, от приблизительно 50 до приблизительно 100, от приблизительно 60 до приблизительно 100, от приблизительно 70 до приблизительно 100, от приблизительно 80 до приблизительно 100 или от приблизительно 100 до приблизительно 1000. В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин, предусмотренный в данном документе, демонстрирует оптимальный коэффициент окклюзии, составляющий от приблизительно 2 до приблизительно 1000. Связывание маскированного полипептида IL-12 с целевым белком до расщепления и/или после расщепления протеазой можно определять с применением методик, хорошо известных из уровня техники, например посредством ELISA.

В некоторых вариантах осуществления маскирующий компонент, описанный в данном документе, связывается с цитокином или его функциональным фрагментом, описанными в данном документе, с аффинностью, более низкой, чем аффинность между цитокином или его функциональный фрагментом и целевым белком (например, рецептором цитокина). В определенных вариантах осуществления маскирующий компонент, предусмотренный в данном документе, связывается с цитокином или его функциональным фрагментом, описанными в данном документе, с константой диссоциации (Kd), составляющей

≥ 500 М, ≥ 250 М, ≥ 200 М, ≥ 150 М, ≥ 100 М, ≥ 50 М, ≥ 10 М, ≥ 1 М, ≥ 500 нМ, ≥ 250 нМ, ≥ 150 нМ, ≥ 100 нМ, ≥ 50 нМ, ≥ 10 нМ, ≥ 1 нМ, ≥ 0,1 нМ, ≥ 0,01 нМ или ≥ 0,001 нМ.

4. ПОЛУЧЕНИЕ МАСКИРОВАННОГО ЦИТОКИНА IL-12

Маскированные цитокины, описанные в данном документе, получают с применением методик, доступных из уровня техники, иллюстративные способы которых описаны.

4.1 **Получение антитела**

Некоторые варианты осуществления маскированного цитокина IL-12 предусматривают антитело или его фрагмент. В следующих разделах представлено дополнительное подробное описание получения антител и фрагментов антител, их вариантов и производных, которые могут применяться в некоторых вариантах осуществления маскированного цитокина IL-12, предусмотренного в данном документе. В

некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин находится в форме димера, полученного с помощью двух копий маскированного цитокина IL-12, которые ассоциированы посредством дисульфидных связей.

1. Фрагменты антител

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает фрагменты антител. Фрагменты антител могут представлять собой любые фрагменты антител, такие как Fc-домен, часть тяжелой цепи, часть легкой цепи, Fab, Fv или scFv, помимо других фрагментов. Фрагменты антител можно получать традиционными способами, такими как ферментативное расщепление, или посредством рекомбинантных методик. В определенных обстоятельствах существуют преимущества в соединении фрагментов антител, а не целых антител, с маскированными цитокинами, описанными в данном документе. Обзор определенных фрагментов антител см. в Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Были разработаны различные методики для получения фрагментов антител. Традиционно данные фрагменты получали посредством протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однако в настоящее время данные фрагменты можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Все из фрагментов антител Fab, Fv и ScFv могут экспрессироваться в E. coli и других типах клеток, таких как клетки HEK293 и CHO, и секретироваться из них, обеспечивая таким образом возможность легкого получения больших количеств данных фрагментов. В качестве альтернативы фрагменты Fab-SH можно непосредственно извлекать из среды для культивирования и химически обеспечивать образование их пар с образованием фрагментов F(ab)2 (Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). Согласно другому подходу фрагменты F(ab)2 можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab)2 с увеличенным периодом полужизни in vivo, содержащие остатки эпитопа связывания FcRN/рецептора реутилизации, описаны в патенте США № 5869046. Другие методики для получения фрагментов антител для применения в маскированных цитокинах будут очевидны практикующему специалисту в данной области техники. В определенных вариантах осуществления маскированный цитокин содержит одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). См. WO 93/16185; патенты США №№ 5571894 и 5587458. На основе scFv могут быть сконструированы слитые белки с получением продукта слияния эффекторного белка либо на амино-конце, либо на карбокси-конце scFv. См. Antibody Engineering, под ред. Borrebaeck, выше. Также в некоторых вариантах осуществления с маскированными цитокинами могут применяться бивалентные scFv, содержащие два scFv, соединенные посредством полипептидного линкера.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает линейное антитело (например, как описано в патенте США № 5641870) или одноцепочечный иммуноглобулин, содержащий последовательности тяжелой и легкой цепи антитела,

соединенные посредством соответствующего линкера. Такие линейные антитела или иммуноглобулины могут быть моноспецифическими или биспецифическими. Такой одноцепочечный иммуноглобулин можно димеризовать с обеспечением таким образом сохранения структуры и видов активности, сходных с таковыми для антитела, которое изначально представляет собой тетрамер. Также в некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент могут представлять собой антитело, которое содержит одну вариабельную область тяжелой цепи и не содержит последовательность легкой цепи. Такое антитело называется однодоменным антителом (sdAb) или нанотелом. Данные антитела также охватываются понятием функционального фрагмента антитела по настоящему изобретению. Фрагменты антител можно соединять с маскированными цитокинами, описанными в данном документе, в соответствии с руководством, предусмотренным в данном документе.

2. Гуманизированные антитела

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает гуманизированные антитела или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела могут представлять собой любые антитела, включая любой фрагмент антитела. Различные способы гуманизации антител, отличных от человеческих, известны из уровня техники. Например, гуманизированное антитело может содержать один или более аминокислотных остатков, введенных в него из донора, отличного от человека. Данные аминокислотные остатки, отличные от человеческих, часто называют «импортными» остатками, которые, как правило, получают из «импортного» вариабельного домена. Гуманизацию можно выполнять главным образом согласно способу Уинтера (Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536), посредством замены последовательностей гипервариабельной области на соответствующие последовательности из антитела человека. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4816567), где по сути менее чем интактный вариабельный домен человека был заменен на соответствующую последовательность от вида, отличного от человека. На практике гуманизированные антитела, как правило, представляют собой антитела человека, где некоторые остатки гипервариабельной области и возможно некоторые остатки FR заменены на остатки из аналогичных сайтов в антителах грызунов. Гуманизированные антитела можно соединять с маскированными цитокинами, описанными в данном документе, в соответствии с руководством, предусмотренным в данном документе.

3. Антитела человека

Антитела человека по некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения могут быть сконструированы посредством комбинирования последовательности(последовательностей) вариабельного домена Fv-клона, выбранной(выбранных) из библиотек фагового дисплея, полученных от человека, с известной(известными) последовательностью(последовательностями) константного

домена человека. В качестве альтернативы моноклональные антитела человека по некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения могут быть получены гибридомным способом, например, посредством применения клеток мыши, крысы, крупного рогатого скота (например, коровы) или кролика, например, для получения моноклональных антител человека. В некоторых вариантах осуществления антитела человека и моноклональные антитела человека могут представлять собой антитела, которые связываются с любым антигеном. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела человека по настоящему изобретению могут быть получены посредством иммунизации животного, отличного от человека, в организме которого содержатся локусы иммуноглобулина человека, с использованием целевого антигена и выделения антитела из организма иммунизированного животного или из клеток, полученных из организма иммунизированного животного. Примеры подходящих животных, отличных от человека, включают трансгенное или трансхромосомное животное, такое как HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.), KM Mouse®, «мыши TC» и Xenomouse™. См., например, Lonberg, et al. (1994) Nature 368: 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; WO 2002/43478; патенты США №№ 5939598; 6075181; 6114598; 6150584; 6162963 и Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727.

[0420] Линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для получения моноклональных антител человека описаны, например, в Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, стр. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк, 1987 г.); и Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991). Антитела человека можно соединять с маскированными цитокинами, описанными в данном документе, в соответствии с руководством, предусмотренным в данном документе.

4. Биспецифические антитела

Биспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые характеризуются специфичностью связывания в отношении по меньшей мере двух разных антигенов. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела представляют собой человеческие или гуманизированные антитела. В некоторых вариантах осуществления одна из специфичностей связывания предназначена для первого антигена и другая специфичность связывания предназначена для второго антигена, которые могут представлять собой либо два разных эпитопа на том же целевом белке, либо два разных эпитопа на двух разных целевых белках. Биспецифические антитела можно также применять для направленной доставки цитотоксических средств к клеткам, которые экспрессируют первый антиген и/или второй антиген. Биспецифические антитела можно также применять для рекрутирования клеток, таких как Т-клетки или естественные клетки-киллеры, для уничтожения определенных клеток, например раковых клеток. Биспецифические антитела можно получать в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифических антител F(ab')2). Биспецифические антитела можно соединять с маскированными цитокинами, описанными в данном

документе, в соответствии с руководством, предусмотренным в данном документе.

Способы получения биспецифических антител известны из уровня техники. См. Milstein и Cuello, Nature, 305: 537 (1983), WO 93/08829, опубликованную 13 мая 1993 года, Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655 (1991); Kontermann и Brinkmann, Drug Discovery Today, 20(7):838-847. Подробную информацию по получению биспецифических антител см., например, в Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986). Биспецифические антитела включают поперечносшитые или «гетероконъюгатные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может образовывать пару с авидином, второе - с биотином. Гетероконъюгатные антитела можно получать с применением любого удобного способа поперечного сшивания. Подходящие средства для поперечного сшивания хорошо известны из уровня техники и раскрыты в патенте США № 4676980 вместе с рядом методик поперечного сшивания.

5. Однодоменные антитела

В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело соединено с маскированным цитокином в соответствии с руководством, предусмотренным в данном документе. Однодоменное антитело может представлять собой любое антитело. Однодоменное антитело представляет собой одну полипептидную цепь, содержащую целый вариабельный домен тяжелой цепи антитела или его часть или целый вариабельный домен легкой цепи антитела или его часть. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека (Domantis, Inc., Уолтем, Массачусетс; см., например, патент США № 6248516 B1). В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело состоит из целого вариабельного домена тяжелой цепи антитела или его части. В некотором варианте осуществления однодоменное антитело представляет собой антитело, полученное от представителя семейства верблюдовых, полученное посредством иммунизации представителя семейства верблюдовых с помощью целевого антигена. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой антитело, полученное от акулы, полученное посредством иммунизации акулы с помощью целевого антигена. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой нанотело (см., например, WO 2004041865A2 и US20070269422A1).

6. Варианты антител

В некоторых вариантах осуществления предусмотрена(предусмотрены) модификация(модификации) аминокислотной последовательности антител или их фрагментов, описанных в данном документе. Например, необходимым может являться улучшение аффинности связывания FcRn и/или pH-зависимой аффинности связывания FcRn антитела. Также необходимым может являться способствование гетеродимеризации тяжелых цепей антитела посредством введения определенных аминокислотных модификаций. Способы для способствования гетеродимеризации цепей антитела, в том числе модификации, которые можно осуществлять для облегчения гетеродимеризации, описаны в Klein et al. (2012), MAbs, 4(6): 653-663.

Варианты аминокислотной последовательности антитела можно получать посредством введения соответствующих изменений в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или посредством синтеза пептида. Такие модификации включают, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в пределах аминокислотной последовательности антитела. Чтобы добиться получения конечной конструкции, может осуществляться любая комбинация делеции, вставки и замены, при условии, что конечная конструкция обладает необходимыми характеристиками. Аминокислотные изменения можно вводить в аминокислотную последовательность антитела субъекта во время получения последовательности.

Применимый способ идентификации определенных остатков или областей антитела, которые являются предпочтительными участками для мутагенеза, называется «аланиновым сканирующим мутагенезом», как описано в Cunningham и Wells (1989) Science, 244:1081-1085. Здесь, остаток или группа целевых остатков идентифицируются (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и замещаются нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином) для воздействия на взаимодействие аминокислот с антигеном. Те аминокислотные положения, которые демонстрируют функциональную восприимчивость к заменам, затем корректируют посредством введения дополнительных или других вариантов в участках замены или вместо них. Таким образом, несмотря на то, что сайт для введения вариации аминокислотной последовательности является предопределенным, нет необходимости в непосредственной предопределенности природы мутации. Например, для анализа характеристики мутации в заданном сайте в целевом кодоне или целевой области проводят аланин-сканирующий или случайный мутагенез, и экспрессированные иммуноглобулины подвергают скринингу в отношении необходимой активности.

Вставки в аминокислотную последовательность предусматривают последовательности, слитые с амино-концом и/или карбокси-концом, длина которых находится в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или больше остатков, а также вставки одного или нескольких аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие варианты вставок в молекулу антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом или полипептидом, которое обеспечивает увеличение периода полужизни антитела в сыворотке крови.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин модифицируют для устранения, снижения уровня расщепления протеазой около шарнирной области или препятствования этому иным путем. Согласно общему определению «шарнирная область» IgG содержит E216 и заканчивается в положении P230 IgGl человека в соответствии с EU-индексом по Kabat, однако с функциональной точки зрения может считаться, что гибкая часть цепи включает дополнительные остатки, называемые верхней и нижней областями шарнирной области, например, от E216 до G237 (Roux et al., 1998 J Immunol 161:4083), и нижняя шарнирная область упоминается как остатки 233-239 Fc-области, к которым в

целом относилось связывание FcγR. Модификации любого из маскированных цитокинов, описанных в данном документе, могут осуществляться, например, согласно способам, описанным в US 20150139984A1, которая включена в данный документ посредством ссылки, а также посредством включения любой из модификаций, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления мутации FcRn, которые улучшают фармакокинетику, включают без ограничения M428L, T250Q/M428L, M252Y/S254T/T256E, P257I/N434H, D376V/N434H, P257I/Q3111, N434A, N434W, M428L/N434S, V259I/V308F, M252Y/S254T/T256E, V259I/V308F/M428L, T307Q/N434A, T307Q/N434S, T307Q/E380A/N434A, V308P/N434A, N434H, V308P. В некоторых вариантах осуществления такие мутации обеспечивают усиление связывания антитела с FcRn при низком значении pH, однако не изменяют аффинность антитела при нейтральном значении pH.

В определенных вариантах осуществления антитело или его фрагмент изменены для повышения или снижения степени гликозилирования антитела. Гликозилирование полипептидов, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного компонента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного компонента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, наличие любой из данных трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров, представляющих собой N-ацетилгалактозамин, галактозу или ксилозу, к гидроксиаминокислоте, наиболее часто к серину или треонину, хотя также могут применяться 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление или делеция сайтов гликозилирования в маскированном цитокине без труда осуществляются посредством изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создается или удаляется один или более из вышеописанных трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение можно также осуществлять посредством добавления, делеции или замены одного или более сериновых или треониновых остатков в последовательности исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования).

В случае если антитело или его фрагмент содержат Fc-область, углевод, присоединенный к ним, может быть изменен. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, в которой отсутствует фукоза, присоединенная к Fc-области антитела, описаны в заявке на патент США № US 2003/0157108 (Presta, L.). См. также US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Антитела с N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) в точках ветвления в углеводе, присоединенном к Fc-области антитела, упоминаются в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. и патенте США № 6602684, Umana et al. Об антителах с по меньшей мере одним

остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области антитела, сообщается в WO 1997/30087, Patel et al. См. также WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.), касающиеся антител с измененным углеводом, присоединенным к их Fc-области. См. также US 2005/0123546 (Umana et al.) в отношении антигенсвязывающих молекул с модифицированным гликозилированием.

В определенных вариантах осуществления вариант гликозилирования предусматривает Fc-область, где углеводная структура, присоединенная к Fc-области, не содержит фукозу или характеризуется сниженным содержанием фукозы. Такие варианты характеризуются улучшенной функцией ADCC. Fc-область в своем составе необязательно дополнительно содержит одну или более аминокислотных замен, что обеспечивает дополнительное улучшение ADCC, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области (нумерация остатков Eu). Примеры публикаций, связанных с «дефукозилированными» или «фукозодефицитными» антителами, включают US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Примеры линий клеток, продуцирующих дефукозилированные антитела, включают клетки CHO Lee 13, дефицитные в отношении фукозилирования белка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 Al, Presta, L и WO 2004/056312 Al, Adams et al., особенно в примере 11), и линии клеток с нокаутом генов, такие как клетки CHO с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)), и клетки со сверхэкспрессией (31,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnT-III) и п-маннозидазы II (Manll) в комплексе Гольджи.

В любом из вариантов осуществления в данном документе маскированный цитокин может быть сконструирован для обеспечения улучшения антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксической (ADCC) активности. В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин можно получать в линии клеток, характеризующейся нокаутом гена альфа-l,6-фукозилтрансферазы (Fut8). В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева модифицируют таким образом, чтобы они характеризовались сниженной собственной активностью альфа-1,6-фукозилирования. Примеры способов модифицирования путей фукозилирования в клетках-хозяевах млекопитающих можно найти, например, в Yamane-Ohnuki и Satoh, MAbs, 1(3): 230-236 (2009), содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. Примеры способов и композиций для частичной или полной инактивации экспрессии гена FUT8 можно найти, например, в публикациях заявок на патент США № 20160194665A 1; WO 2006133148A2, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин получают в варианте Lecl3 клеток CHO (см., например, Shields et al., J. Biol. Chem., 277(30):26733-40 (2002)) или линии

клеток YB2/0, характеризующейся сниженной активностью FUT8 (см., например, Shinkawa et al., J. Biol. Chem., 278(5): 3466-73 (2003)). В некоторых вариантах осуществления может быть введена малая интерферирующая РНК (siRNA), направленная в отношении генов, имеющих отношение к альфа-1,6-фукозилированию (см., например, Mori et al., Biotechnol. Bioeng. 88(7): 901-908 (2004); Imai-Nishiya et al., BMC Biotechnol. 7: 84 (2007); Omasa et al., J. Biosci. Bioeng., 106(2): 168¬173 (2008)). В некоторых дополнительных вариантах осуществления маскированный цитокин можно получать в линии клеток со сверхэкспрессией |31,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnT-III). В дополнительных вариантах осуществления линия клеток дополнительно характеризуется сверхэкспрессией п-маннозидазы II (Manll) в комплексе Гольджи. В некоторых из вариантов осуществления в данном документе маскированный цитокин может содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая обеспечивает улучшение ADCC-активности.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин изменяют для улучшения его периода полужизни в сыворотке крови. Для увеличения периода полужизни цитокина в сыворотке крови можно включать эпитоп связывания FcRN/рецептора реутилизации в присоединенное антитело (в особенности, фрагмент антитела), как описано, например, в патенте США № 5739277. Используемый в данном документе термин «эпитоп связывания рецептора реутилизации» относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG (например, IgGl, IgG2, IgG3 или IgG4), который отвечает за увеличение периода полужизни молекулы IgG в сыворотке крови in vivo (US 2003/0190311, патент США № 6821505; патент США № 6165745; патент США № 5624821; патент США № 5648260; патент США № 6165745; патент США № 5834597).

Другой тип варианта представляет собой вариант с аминокислотной заменой. Данные варианты характеризуются наличием в молекуле антитела по меньшей мере одного аминокислотного остатка, замененного на другой остаток. Сайты, представляющие интерес с точки зрения заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные области, однако также предусмотрены изменения FR. Консервативные замены показаны в таблице 3 под заголовком «Предпочтительные замены». Если такие замены приводят к обеспечению необходимого изменения в биологической активности, то можно вводить более существенные изменения, обозначенные в таблице 3 как «иллюстративные замены», или дополнительно описанные ниже в отношении классов аминокислот, и проводить скрининг продуктов.

Исходный остаток	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Существенные модификации биологических свойств антител осуществляют посредством выбора замен, которые значительно различаются по их эффекту в отношении сохранения (a) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде слоистой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (c) объемности боковой цепи. Аминокислоты можно группировать в соответствии со сходствами свойств их боковых цепей (в A. L. Lehninger, в Biochemistry, второе изд., стр. 73-75, Worth Publishers, Нью-Йорк (1975)):

(1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), lie (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) незаряженные полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gin (Q)

(3) кислотные: Asp (D), Glu (E)

(4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H).

В качестве альтернативы встречающиеся в природе остатки можно подразделять на группы на основании общих свойств боковых цепей:

(1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, he;

(2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gin;

(3) кислотные: Asp, Glu;

(4) основные: His, Lys, Arg;

(5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;

(6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены подразумевают замену представителя одного из данных классов представителем другого класса. Такие замененные остатки также можно вводить в консервативные сайты замены или в остальные (неконсервативные) сайты.

Другой тип заместительного варианта включает замену встречающегося в природе аминокислотного остатка на не встречающийся в природе аминокислотный остаток. Не встречающиеся в природе аминокислотные остатки можно включать, например, посредством перекодировки с помощью тРНК или посредством любого из способов, описанных, например, в WO 2016154675A1, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Один тип варианта замены включает замену одного или более остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). В целом, полученный вариант(варианты), выбранный для дальнейшей разработки, будет обладать модифицированными (например, улучшенными) биологическими свойствами по сравнению с исходным антителом, из которого он был получен. Удобный способ получения таких заместительных вариантов включает созревание аффинности с применением фагового дисплея, дисплея на клетках дрожжей или дисплея на клетках млекопитающих. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) подвергают мутации с получением всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Антитела, полученные таким образом, представляют на нитевидных фаговых частицах в виде продуктов слияния с по меньшей мере частью белка оболочки фага (например, продукта гена III из M13), упакованных в каждой частице. Представленные с помощью фагового дисплея варианты затем подвергают скринингу в отношении их биологической активности (например, аффинности связывания). С целью идентификации сайтов гипервариабельной области, являющихся кандидатами для модификации, можно выполнять сканирующий мутагенез (например, аланиновое сканирование) для идентификации остатков гипервариабельной области, оказывающих значительное влияние на связывание антигена. В качестве альтернативы или дополнительно целесообразным может являться проведение анализа кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактирующие остатки и соседние остатки являются кандидатами для замены согласно методикам, известным из уровня техники, включающим таковые, подробно описанные в данном документе. После получения таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу с применением методик, известных из уровня техники, включающих таковые, описанные в данном документе, и антитела с превосходными свойствами по результатам одного или более соответствующих анализов могут быть выбраны для дальнейшей разработки.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей варианты аминокислотной последовательности маскированных цитокинов, получают посредством ряда способов, известных из уровня техники. Данные способы включают без ограничения выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной

последовательности) или получение посредством олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, мутагенеза с помощью ПЦР и кассетного мутагенеза полученного ранее варианта или версии антитела, не являющейся его вариантом, в качестве примера.

Необходимым может быть введение одной или более аминокислотных модификаций в Fc-область антител по настоящему изобретению с получением таким образом варианта Fc-области. Вариант Fc-области может предусматривать последовательность Fc-области человека (например, Fc-области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более аминокислотных положениях, в том числе аминокислотную модификацию цистеина шарнирной области.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин, предусмотренный в данном документе, содержит антитело или его фрагмент, относящиеся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, или IgG4 с усиленной эффекторной функцией. В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин, предусмотренный в данном документе, содержит антитело или его фрагмент, относящиеся к изотипу IgG1 с усиленной эффекторной функцией. В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин, предусмотренный в данном документе, относится к изотипу IgG1 с усиленной эффекторной функцией. В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин характеризуется повышенными уровнями маннозных компонентов. В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин характеризуется повышенными уровнями гликановых компонентов в точках ветвления. В некоторых вариантах осуществления IgG1 содержит аминокислотные мутации.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин, предусмотренный в данном документе, содержит антитело, относящиеся к изотипу IgG1 (например, изотипу IgG1 человека). В некоторых вариантах осуществления IgG1 содержит одну или более аминокислотных замен, обеспечивающих усиление эффекторной функции. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены S298A, E333A и K334A, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены S239D и I332E, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены S239D, A330L и I332E, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены P247I и A339D или A339Q, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены D280H, K290S с S298D или S298V или без них, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены F243L, R292P и Y300L, где аминокислотные остатки

пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены F243L, R292P, Y300L и P396L, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены G236A, S239D и I332E, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены K326A и E333A, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены K326W и E333S, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены K290E, S298G, T299A с K326E или без нее, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены K290N, S298G, T299A с K326E или без нее, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотную замену K334V, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены L235S, S239D и K334V, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены K334V и Q331M, S239D, F243V, E294L или S298T, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены E233L, Q311M и K334V, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены L234I, Q311M и K334V, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены K334V и S298T, A330M или A330F, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены K334V, Q311M и либо A330M, либо A330F, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены K334V, S298T и либо A330M, либо A330F, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены K334V, S239D и либо A330M, либо S298T, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены L234Y, Y296W и K290Y, F243V или E294L, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены Y296W и либо L234Y, либо K290Y, где аминокислотные остатки пронумерованы в

соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены S239D, A330S и I332E, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat.

В некоторых вариантах осуществления IgG1 содержит одну или более аминокислотных замен, которые обеспечивают снижение или подавление эффекторной функции. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотную замену N297A, N297G или N297Q, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотную замену L234A или L235A, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены C220S, C226S, C229S и P238S, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены C226S, C229S, E233P, L234V и L235A, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены L234F, L235E и P331S, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat. В одном варианте осуществления IgG1 содержит аминокислотные замены S267E и L328F, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом по Kabat.

Согласно данному описанию и сведениям из уровня техники предусматривается, что в некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент из маскированного цитокина могут содержать одно или более изменений по сравнению с соответствующим антителом дикого типа, например, в Fc-области. Например, предполагается, что в Fc-области можно осуществлять определенные изменения, которые будут приводить к измененному (т. е. либо улучшенному, либо сниженному) связыванию C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в WO 99/51642. См. также Duncan и Winter Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821 и WO 94/29351, касающиеся других примеров вариантов Fc-области. В WO00/42072 (Presta) и WO 2004/056312 (Lowman) описаны варианты антитела с улучшенным или сниженным связыванием с FcR. Содержание данных патентных публикаций конкретно включено в данный документ посредством ссылки. См. также Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Антитела с увеличенными периодами полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описаны в US 2005/0014934A1 (Hinton et al.). Данные антитела содержат Fc-область с одной или более заменами, которые обеспечивают улучшение связывания Fc-области с FcRn. Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области и повышенной или сниженной способностью к связыванию C1q описаны в патенте США № 6194551B1, WO 99/51642. Содержание данных патентных публикаций конкретно включено в данный документ посредством ссылки. См. также Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

4.2 **Конъюгаты маскированный цитокин IL-12-лекарственное средство**

Настоящее изобретение также предусматривает конъюгаты маскированный цитокин IL-12-лекарственное средство (MCDC), содержащие маскированный цитокин IL-12, предусмотренный в данном документе, который может представлять собой любой маскированный цитокин IL-12, раскрытый в данном документе, конъюгированный с одним или более средствами. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств представляют собой цитотоксическое средство, такое как химиотерапевтическое средство или лекарственное средство, средство, подавляющее рост, токсин (например, белковый токсин, ферментативно активный

токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивные изотопы. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств представляют собой иммуностимулятор.

В некоторых вариантах осуществления одно или более лекарственных средств, конъюгированных с маскированным цитокином IL-12, включают без ограничения майтанзиноид (см. патенты США №№ 5208020, 5416064 и европейский патент EP 0 425 235 Bl); ауристатин, как, например, компоненты DE и DF лекарственного средства на основе монометилауристатина (MMAE и MMAF) (см. патенты США №№ 5635483, и 5780588, и 7498298); доластатин; калихеамицин или его производное (см. патенты США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman et ak, Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); и Lode et ak, Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубицин (см. Kratz et ak, Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et ak, Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et ak, Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et ak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et ak, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et ak, J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002) и патент США № 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел; трихотецен и CC1065.

В другом варианте осуществления одно или более лекарственных средств, конъюгированных с маскированным цитокином IL-12, включают без ограничения ингибитор полимеризации тубулина (например, майтанзиноиды и ауристатины), средства, повреждающие ДНК (например, димеры пирролобензодиазепина (PBD), калихеамицины, дуокармицины и димеры индолинобензодиазепина), и ингибиторы синтеза ДНК (например, производное экзатекана Dxd).

В другом варианте осуществления конъюгат маскированный цитокин IL-12-лекарственное средство содержит маскированный цитокин IL-12, описанный в данном документе, конъюгированный с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая без ограничения А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из Pseudomonas aeruginosa), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модеццина, альфа-сарцин, белки из Aleurites fordii, белки диантины, белки из Phytolaca americana (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из Momordica charantia, курцин, кротин, ингибитор из Sapaonaria officinalis, гелонин, митогеллин,

рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

В другом варианте осуществления конъюгат маскированный цитокин IL-12-лекарственное средство содержит маскированный цитокин IL-12, описанный в данном документе, конъюгированный с радиоактивным атомом с образованием радиоконъюгата. Ряд радиоактивных изотопов доступен для получения радиоконъюгатов. Примеры включают At211,1131,1125, Y90, Rel86, Rel88, Sml53, B1212, P32, Pb212 и радиоактивные изотопы Lu. Если радиоконъюгат применяется для выявления, он может содержать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например tc99m или 1123, или спиновую метку для ядерной магнитно-резонансной визуализации (ЯМР) (также известной как магнитно-резонансная визуализация, MRI), такую как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат маскированный цитокин IL-12-лекарственное средство содержит маскированный цитокин IL-12, описанный в данном документе, конъюгированный с одним или более иммуностимуляторами. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулятор представляет собой агонист стимулятора генов интерферона (STING) или агонист toll-подобного рецептора (TER).

Агонист STING может представлять собой любой агонист STING. В некоторых вариантах осуществления агонист STING представляет собой циклический динуклеотид (CDN). CDN может представлять собой любой CDN или его производное или вариант. В некоторых вариантах осуществления агонист STING представляет собой CDN, выбранный из группы, состоящей из cGAMP, c-di-AMP, c-di-GMP, cAIMP и c-di-IMP. В некоторых вариантах осуществления агонист STING представляет собой производное или вариант CDN, выбранные из группы, состоящей из cGAMP, c-di-AMP, c-di-GMP, cAIMP и c-di-IMP. В некоторых вариантах осуществления агонист STING представляет собой 4-(2-хлор-6-фторбензил)-N-(фуран-2-илметил)-3-оксо-3,4-дигидро-2H-бензо[b][l,4]тиазин-6-карбоксамид или его производное или вариант. *См., например,* Sali et al. (2015) PloS Pathog., 11(12): e!005324.

Агонист TLR может представлять собой агонист любого TLR, такого как TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 или TLR10. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR представляет собой агонист TLR, экспрессируемого на клеточной поверхности, такого как TLR1, TLR2, TLR4 или TLR5. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR представляет собой агонист TLR, экспрессируемого внутриклеточно, такого как TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 или TLR10.

Конъюгаты маскированного цитокина IL-12 и цитотоксического средства можно получать с применением ряда бифункциональных средств, обеспечивающих образование связи с белком, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HC1), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-

азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин, представляющий собой рицин, можно получать, как описано в Vitetta et ah, Science 238:1098 (1987). Меченная углеродом-14 l-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминопентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой иллюстративное хелатирующее средство для конъюгации радионуклеотида с антителом. *См.* W094/11026. Линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», обеспечивающий высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно применять кислотолабильный линкер, пептидазочувствительный линкер, фотолабильный линкер, диметиловый линкер или дисульфид-содержащий линкер (Chari et ah, Cancer Res. 52:127-131 (1992); патент США № 5208020).

MCDC в данном документе прямо предусматривают без ограничения такие конъюгаты, полученные с помощью поперечносшивающих реагентов, включающих без ограничения BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC,

MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, и сульфо-SMPB, и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфонбензоат), которые являются коммерчески доступными (например, от Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс, США).

4.3 **Векторы, клетки-хозяева и способы на основе рекомбинации**

Для получения маскированного цитокина IL-12 по настоящему изобретению посредством рекомбинации, одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих его, выделяют и вставляют в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации

ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующую маскированный цитокин IL-12, включая его компоненты, легко выделяют и секвенируют с применением общепринятых процедур. Доступно множество векторов. Выбор вектора частично зависит от клетки-хозяина, которую будут применять. Обычно клетки-хозяева имеют либо прокариотическое, либо эукариотическое (обычно от млекопитающих) происхождение. Будет понятно, что для данной цели можно применять константные области антитела любого изотипа или его фрагмента, где это применимо, в том числе константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области можно получать от человека или любого вида животных. В некоторых вариантах осуществления для кодирования маскированного цитокина IL-12 применяется один вектор. В некоторых вариантах осуществления для кодирования маскированного цитокина IL-12 применяется более чем один вектор.

1. Получение маскированных цитокинов IL-12 с применением прокариотических клеток-хозяев

Конструкция вектора

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты маскированных цитокинов по настоящему изобретению, можно получать с применением

стандартных методик на основе рекомбинации. Необходимые полинуклеотидные последовательности антитела или его фрагмента можно выделять и секвенировать из клеток, продуцирующих антитело, таких как гибридомные клетки. В качестве альтернативы полинуклеотиды можно синтезировать с применением устройства для синтеза нуклеотидов или методик PGR или получать из других источников. После получения, последовательности, кодирующие компоненты маскированного цитокина, вставляют в рекомбинантный вектор, обладающий способностью к репликации и экспрессии гетерологичных полинуклеотидов в прокариотических хозяевах. Для цели настоящего изобретения можно применять множество векторов, которые являются доступными и известными в данной области техники. Выбор соответствующего вектора будет зависеть в основном от размера нуклеиновых кислот, подлежащих вставке в вектор, и конкретной клетки-хозяина, подлежащей трансформации с помощью вектора. Каждый вектор содержит различные компоненты в зависимости от его функции (амплификации или экспрессии гетерологичного полинуклеотида, или и того, и другого) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он располагается. Компоненты вектора обычно включают без ограничения точку начала репликации, селективный маркерный ген, промотор, участок связывания с рибосомой (RBS), сигнальную последовательность, вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты и последовательность терминации транскрипции.

В целом, плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые получают от вида, совместимого с клеткой-хозяином, применяются в отношении данных хозяев. Вектор, как правило, несет сайт репликации, а также маркерные последовательности, которые способны обеспечивать фенотипическую селекцию в трансформированных клетках. Например, E. coli, как правило, трансформируют с применением pBR322, - плазмиды, полученной из вида E. coli. pBR322 содержит гены, кодирующие устойчивость к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet), и таким образом обеспечивает легкий способ идентификации трансформированных клеток. pBR322, ее производные или другие микробные плазмиды или бактериофаг могут также содержать, или могут быть модифицированы таким образом, чтобы они содержали промоторы, которые могут использоваться микробным организмом для экспрессии эндогенных белков. Примеры производных pBR322, применяемых для экспрессии конкретных антител, подробно описаны в Carter et ah, патенте США № 5648237.

Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином, можно применять в качестве трансформирующих векторов в отношении данных хозяев. Например, бактериофаг, такой как 7GEM.TM.-11, можно использовать в получении рекомбинантного вектора, который можно применять для трансформации восприимчивых клеток-хозяев, таких как E. coli LE392.

Вектор экспрессии по настоящему изобретению может содержать две или более пар промотор-цистрон, кодирующих каждый из полипептидных компонентов. Промотор

представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, расположенную выше (5') цистрона, которая модулирует его экспрессию. Прокариотические промоторы, как правило, относятся к двум классам, - индуцируемому и конститутивному. Индуцируемый промотор представляет собой промотор, который стимулирует повышение уровней транскрипции цистрона, находящегося под его контролем, в ответ на изменения условий культивирования, например наличие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры.

Хорошо известно большое число промоторов, распознаваемых рядом потенциальных клеток-хозяев. Выбранный промотор может быть функционально связан с ДНК цистрона, кодирующей любую цепь маскированного цитокина, посредством удаления промотора из ДНК источника путем расщепления рестрикционным ферментом и вставки выделенной последовательности промотора в вектор по настоящему изобретению. Для управления амплификацией и/или экспрессией целевых генов можно применять как нативную последовательность промотора, так и множество гетерологичных промоторов.

В некоторых вариантах осуществления используются гетерологичные промоторы, поскольку они обычно обеспечивают более высокий уровень транскрипции и более высокий выход экспрессируемого целевого гена по сравнению с нативным промотором целевого полипептида.

Промоторы, подходящие для применения с прокариотическими хозяевами, включают промотор PhoA, промоторные системы на основе [3-галактамазы и лактозы, промоторную систему на основе триптофана (trp) и гибридные промоторы, такие как промотор tac или trc. Однако другие промоторы, которые являются функциональными у бактерий (такие как другие известные бактериальные или фаговые промоторы), также являются подходящими. Их нуклеотидные последовательности опубликованы, что обеспечивает возможность квалифицированному специалисту функционально лигировать их с цистронами, кодирующими, например, целевые легкие и тяжелые цепи для маскированных цитокинов, содержащих легкую и тяжелую цепь (Siebenlist et al. (1980) Cell 20:269), с применением линкеров или адаптеров для обеспечения любых необходимых сайтов рестрикции.

В одном аспекте настоящего изобретения каждый цистрон в пределах рекомбинантного вектора содержит компонент секреторной сигнальной последовательности, который управляет перемещением экспрессируемых полипептидов через мембрану. В целом, сигнальная последовательность может представлять собой компонент вектора или она может представлять собой часть ДНК целевого полипептида, которая вставлена в вектор. Сигнальная последовательность, выбранная для цели настоящего изобретения, должна представлять собой таковую, которая распознается и процессируется (т. е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальные последовательности, нативные по отношению к гетерологичным полипептидам, сигнальную последовательность заменяют прокариотической сигнальной

последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или лидерных последовательностей термостабильного энтеротоксина II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA и MBP. В одном варианте осуществления настоящего изобретения сигнальные последовательности, применяемые в обоих цистронах системы экспрессии, представляют собой сигнальные последовательности STII или их варианты.

В другом аспекте получение полипептидных компонентов по настоящему изобретению может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, таким образом, не требует присутствия секреторных сигнальных последовательностей в пределах каждого цистрона. В этой связи, что касается вариантов осуществления, предусматривающих легкую и тяжелую цепи иммуноглобулина, например, легкая и тяжелая цепи экспрессируются с последовательностями для маскирующего компонента, линкерной последовательностью и т. д. или без них, сворачиваются и собираются с образованием функциональных иммуноглобулинов в цитоплазме. Некоторые штаммы-хозяева (например, штаммы E. coli trxB) обеспечивают условия в цитоплазме, которые являются благоприятными для образования дисульфидной связи, тем самым обеспечивая надлежащее сворачивание и сборку экспрессируемых белковых субъединиц. Proba и Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

Маскированные цитокины по настоящему изобретению можно также получать посредством применения системы экспрессии, где количественное соотношение экспрессируемых полипептидных компонентов можно модулировать с целью максимизации выхода секретируемых и надлежащим образом собранных антител по настоящему изобретению. Такая модуляция осуществляется по меньшей мере частично посредством одновременного модулирования показателей интенсивности трансляции для полипептидных компонентов.

Прокариотические клетки-хозяева, подходящие для экспрессии антител по настоящему изобретению, включают Archaebacteria и Eubacteria, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы. Примеры пригодных бактерий включают бактерии рода Escherichia (например, E. coli), Bacilli (например, B. subtilis), Enterobacteria, видов рода Pseudomonas (например, P. aeruginosa), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, бактерии рода Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla или Paracoccus. В одном варианте осуществления применяются грамотрицательные клетки. В одном варианте осуществления для настоящего изобретения в качестве хозяев применяют клетки E. coli. Примеры штаммов E. coli включают штамм W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, том 2 (Вашингтон: Американское общество микробиологии, 1987 г.), ср. 1190-1219; номер депонирования в ATCC 27325) и его производные, в том числе штамм 33D3, имеющий генотип W3110 AfhuA (AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompTA(nmpc-fepE) degP41 kanR (патент США № 5639635). Также подходящими являются другие штаммы и их производные, такие как E. coli 294 (номер депонирования в ATCC 31446), E. coli B, E. colik 1776 (номер депонирования в ATCC 31537) и E. coli RV308 (номер депонирования в ATCC 31608). Данные примеры являются иллюстративными, а не ограничивающими. Способы

конструирования производных любых из вышеупомянутых бактерий, имеющих определенные генотипы, известны из уровня техники и описаны, например, в Bass et ah, Proteins, 8:309-314 (1990). В общем случае необходимо выбрать соответствующую бактерию, принимая во внимание способность репликона к репликации в клетках бактерии. Например, если для обеспечения репликона применяют хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410, в качестве хозяина можно соответствующим образом применять виды E. coli, Serratia или Salmonella. Как правило, клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, и при необходимости в культуру клеток можно включать дополнительные ингибиторы протеазы.

Получение маскированного цитокина

Клетки-хозяева трансформируют с помощью вышеописанных векторов экспрессии и культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных соответствующим образом для стимуляции промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих необходимые последовательности.

Трансформация означает введение ДНК в прокариотического хозяина таким образом, чтобы ДНК могла реплицироваться либо в виде внехромосомного элемента, либо посредством интегрированного в хромосому элемента. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию осуществляют с применением стандартных методик, соответствующих таким клеткам. Обработку кальцием с использованием хлорида кальция обычно используют для бактериальных клеток, которые содержат существенные барьеры в виде клеточной стенки. В другом способе трансформации используется полиэтиленгликоль/DMSO. Еще одна другая применяемая методика представляет собой электропорацию.

Прокариотические клетки, применяемые для получения маскированных цитокинов по настоящему изобретению, выращивают в средах, известных из уровня техники и подходящих для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред включают среду Луриа (LB) с необходимыми питательными добавками. В некоторых вариантах осуществления среды также содержат селективное средство, выбранное на основе конструкции вектора экспрессии, для обеспечения селективного роста прокариотических клеток, содержащих вектор экспрессии. Например, в среды для выращивания клеток, экспрессирующих ген устойчивости к ампициллину, добавляют ампициллин.

Любые необходимые добавки, помимо источников углерода, азота и неорганического фосфата, также можно включать в соответствующих концентрациях, вводимых по отдельности или в виде смеси с другой добавкой или средой, такой как комплексный источник азота. Среда для культивирования может необязательно содержать одно или несколько восстанавливающих средств, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамина, тиогликолята, дитиоэритритола и дитиотреитола.

Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящих значениях температуры. В определенных вариантах осуществления для выращивания E. coli значения

температуры для выращивания находятся в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C; от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C или приблизительно 30°C. Значение pH среды может представлять собой любое значение pH в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 9, что главным образом зависит от организма-хозяина. В определенных вариантах осуществления для E. coli значение pH составляет от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,4 или приблизительно 7,0.

Если в векторе экспрессии по настоящему изобретению применяется индуцируемый промотор, экспрессию белка индуцируют в условиях, подходящих для активации промотора. В одном аспекте настоящего изобретения для контроля транскрипции полипептидов применяют промоторы PhoA. Соответственно, трансформированные клетки-хозяева культивируют в среде для индукции, содержащей ограниченное количество фосфата. В определенных вариантах осуществления среда, содержащая ограниченное количество фосфата, представляет собой среду C.R.A.P. (см., например, Simmons et ah, J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Можно применять ряд других индуцирующих средств в соответствии с используемой конструкцией вектора, как известно из уровня техники.

В одном варианте осуществления экспрессируемые маскированные цитокины по настоящему изобретению секретируются в периплазму клеток-хозяев и извлекаются из нее. Извлечение белка, как правило, включает разрушение микроорганизма, обычно посредством способов, таких как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. После разрушения клеток клеточный дебрис или цельные клетки можно удалять посредством центрифугирования или фильтрации. Белки можно подвергать дополнительной очистке, например, посредством хроматографии на аффинных смолах. В качестве альтернативы белки можно переносить в среды для культивирования и выделять из них. Клетки можно удалять из культуры, и надосадочную жидкость культуры можно фильтровать и концентрировать для дополнительной очистки полученных белков. Экспрессируемые полипептиды можно дополнительно выделять и идентифицировать с применением общеизвестных способов, таких как электрофорез на полиакриламидном геле (PAGE) и анализ методом вестерн-блоттинга.

В одном аспекте настоящего изобретения получение маскированного цитокина проводят в большом количестве посредством процесса ферментации. Для получения рекомбинантных белков доступны различные крупномасштабные периодические процедуры ферментации с подпиткой. Крупномасштабные процедуры ферментации характеризуются производительностью, составляющей по меньшей мере 1000 литров, и в определенных вариантах осуществления - емкостью, составляющей от приблизительно 1000 до 100000 литров. В таких ферментерах применяются лопастные мешалки для распределения кислорода и питательных веществ, в частности глюкозы. Мелкомасштабная ферментация в общем случае относится к ферментации в ферментере, объемная производительность которого составляет не более чем приблизительно 100 литров и может находиться в диапазоне от приблизительно 1 литра до приблизительно 100 литров.

В процессе ферментации индукцию экспрессии белка, как правило, начинают после того, как клетки вырастают при подходящих условиях до необходимой плотности, например OD550, составляющей приблизительно 180-220, на данной стадии клетки находятся в ранней стационарной фазе. Можно применять ряд индуцирующих средств в соответствии с используемой конструкцией вектора, как известно из уровня техники и описано выше. Клетки можно выращивать в течение более коротких периодов перед индукцией. Клетки обычно индуцируют в течение приблизительно 12-50 часов, хотя можно применять более длительное или более короткое время индукции.

Для улучшения выхода продукции и качества полипептидов по настоящему изобретению можно модифицировать различные условия ферментации. Например, для обеспечения улучшения в отношении надлежащей сборки и сворачивания, например, секретируемых полипептидов антител можно применять дополнительные векторы со сверхэкспрессией белков-шаперонов, таких как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и/или DsbG) или FkpA (пептидилпролил-цис, транс-изомераза с активностью шаперона) для совместной трансформации прокариотических клеток-хозяев. Было показано, что белки-шапероны облегчают надлежащее сворачивание и растворимость гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605; Georgiou et ak, патент США № 6083715; Georgiou et ak, патент США № 6027888; Bothmann и Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm и Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et ak (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

Для минимизации протеолиза экспрессируемых гетерологичных белков (в особенности, таковых, чувствительных к протеолизу) для настоящего изобретения можно применять определенные штаммы-хозяева, дефицитные в отношении протеолитических ферментов. Например, штаммы клеток-хозяев можно модифицировать с получением генетической мутации(мутаций) в генах, кодирующих известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их комбинации. Некоторые штаммы E. coli, дефицитные в отношении протеазы, являются доступными и описаны, например, в Joly et al (1998), выше; Georgiou et ak, патенте США № 5264365; Georgiou et ak, патенте США № 5508192; Kara et ak, Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

В некоторых вариантах осуществления штаммы E. coli, дефицитные в отношении протеолитических ферментов и трансформированные с помощью плазмид со сверхэкспрессией одного или более белков-шаперонов, применяют в качестве клеток-хозяев в системе экспрессии по настоящему изобретению.

Очистка маскированного цитокина

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин, полученный в данном документе, подвергают дополнительной очистке с получением препаратов, которые являются по сути гомогенными, для дальнейших анализов и путей применения. Можно использовать стандартные способы очистки белка, известные из уровня техники. Следующие способы приведены в качестве примера подходящих процедур очистки:

фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, HPLC с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния или катионообменной смоле, такой как DEAE, хроматофокусирование, SDS-PAGE, осаждение сульфатом аммония и гель-фильтрация с применением, например, Sephadex G-75.

В некоторых вариантах осуществления белок А, иммобилизованный на твердой фазе, применяется для иммуноаффинной очистки маскированных цитокинов по настоящему изобретению. Белок А представляет собой белок клеточной стенки массой 41 кДа из Staphylococcus aureas, который связывается с высокой аффинностью с Fc-областью антител. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. Твердая фаза, на которой иммобилизован белок А, может представлять собой колонку, содержащую стеклянную или кремнеземную поверхность, или стеклянную колонку с контролируемым размером пор, или колонку с кремниевой кислотой. В некоторых путях применения колонку покрывают реагентом, таким как глицерин, для предотвращения неспецифической адгезии примесей.

В качестве первой стадии очистки препарат, полученный из культуры клеток, как описано выше, можно помещать на твердую фазу с иммобилизованным белком А для обеспечения специфического связывания маскированного цитокина, представляющего интерес, с белком А. Затем твердую фазу промывают для удаления примесей, неспецифически связанных с твердой фазой. Наконец, маскированный цитокин, представляющий интерес, извлекают из твердой фазы посредством элюирования.

Можно использовать другие способы очистки, которые обеспечивают высокоаффинное связывание с компонентом маскированного цитокина, в соответствии со стандартными способами очистки белка, известными из уровня техники.

2. ***Получение маскированных цитокинов с применением эукариотических клеток-хозяев***

Вектор для применения в эукариотической клетке-хозяине обычно содержит один или более из следующих неограничивающих компонентов: сигнальная последовательность, точка начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

Компонент, представляющий сбой сигнальную последовательность

Вектор для применения в эукариотической клетке-хозяине может также содержать сигнальную последовательность или другой полипептид, содержащие специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида, представляющих интерес. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность может представлять собой таковую, распознаваемую и процессируемую (т. е. расщепляемую сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для экспрессии в клетках млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например gD-сигнал вируса простого герпеса.

ДНК для области такого предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей маскированный цитокин.

Точка начала репликации

Обычно компонент, представляющий собой точку начала репликации, не является необходимым для векторов экспрессии млекопитающих. Например, точку начала репликации SV40, как правило, можно применять только потому, что она содержит ранний промотор.

Компонент, представляющий собой селективный ген

Векторы для экспрессии и клонирования могут содержать селективный ген, также называемый селектируемым маркером. Типичные селективные гены кодируют белки, которые (a) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (b) обеспечивают восполнение видов ауксотрофной недостаточности, где это применимо, или (c) обеспечивают жизненно важные питательные вещества, которые не доступны в комплексных средах.

В одном примере схемы селекции используется лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые были успешно трансформированы с помощью гетерологичного гена, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному средству, и, таким образом, выживают в режиме селекции. В примерах такой доминантной селекции применяются лекарственные средства, представляющие собой неомицин, микофеноловую кислоту и гигромицин.

Другим примером подходящих селектируемых маркеров для клеток млекопитающих являются таковые, которые обеспечивают идентификацию клеток, компетентных в отношении поглощения нуклеиновой кислоты, кодирующей маскированный цитокин, такие как DHFR, тимидинкиназа, металлотионеин I и II, гены металлотионеина приматов, аденозиндезаминаза, орнитиндекарбоксилаза и т. п.

Например, в некоторых вариантах осуществления клетки, трансформированные с помощью селективного гена DHFR, сначала идентифицируют посредством культивирования всех трансформантов в среде для культивирования, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. В некоторых вариантах осуществления соответствующая клетка-хозяин для использования DHFR дикого типа представляет собой линию клеток яичника китайского хомяка (CHO), дефицитную в отношении активности DHFR (например, CRL-9096 в ATCC).

В качестве альтернативы клетки-хозяева (в частности, хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или совместно трансформированные с помощью последовательностей ДНК, кодирующих маскированный цитокин, белок DHFR дикого типа и другой селективный маркер, такой как аминогликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можно подвергать селекции посредством выращивания клетки в среде, содержащей селективное средство для селектируемого маркера, такое как аминогликозидный антибиотик, например канамицин, неомицин или G418. См. патент США № 4965199. Клетки-хозяева могут включать NS0, в том числе линии клеток, дефицитные в отношении глутаминсинтетазы (GS). Способы применения GS в качестве селектируемого маркера для клеток млекопитающих описаны в патенте США № 5122464 и патенте США № 5891693.

Компонент, представляющий собой промотор

Векторы для экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей маскированный цитокин, представляющий интерес, который может представлять собой любой маскированный цитокин, описанный в данном документе. Промоторные последовательности для эукариот являются известными. Например, практически все гены эукариот содержат область, богатую АТ, расположенную на примерно 25-30 оснований выше от сайта, где начинается транскрипция. Другая последовательность, находящаяся на 70-80 оснований выше точки начала транскрипции во многих генах, представляет собой область CNCAAT, где N может представлять собой любой нуклеотид. На 3'-конце большинства генов эукариот располагается последовательность AATAAA, которая может представлять собой сигнал для добавления хвоста поли(А) к 3'-концу кодирующей последовательности. В определенных вариантах осуществления любую или все из данных последовательностей можно подходящим образом вставлять в эукариотические векторы экспрессии.

Транскрипция с векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, промотора актина или промотора иммуноглобулина, из промоторов белков теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клетки-хозяина.

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит вирусную точку начала репликации SV40. Немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде рестрикционного фрагмента, обеспечиваемого HindIII E. Система для обеспечения экспрессии ДНК у хозяев-млекопитающих с применением вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора раскрыта в патенте США № 4419446. Модификация данной системы описана в патенте США № 4601978. См. также Reyes et ah, Nature 297:598-601 (1982), в которой описана экспрессия кДНК [3-интерферона человека в клетках мыши под контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. В качестве альтернативы длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса можно применять в качестве промотора.

Компонент, представляющий собой энхансерный элемент

Транскрипция ДНК, кодирующей маскированный цитокин по настоящему изобретению, у высших эукариот часто повышается посредством вставки энхансерной последовательности в вектор. В настоящее время известно множество энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (генов глобина, эластазы, альбумина, α-фетопротеина и инсулина). Однако, как правило, применяют энхансер из вируса эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40 на участке позднего начала репликации (100-270 п. о.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса человека,

энхансер раннего промотора цитомегаловируса мыши, энхансер вируса полиомы на участке позднего начала репликации и энхансеры аденовируса. *См. также* Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) (в которой описаны энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов). Энхансер может быть вставлен посредством сплайсинга в вектор

в положении, находящемся в направлении 5' или 3' по отношению к последовательности, кодирующей маскированный цитокин, однако обычно он располагается в сайте, расположенном в направлении 5' от промотора.

Компонент, представляющий собой последовательность терминации транскрипции

Векторы экспрессии, применяемые в эукариотических клетках-хозяевах, могут также содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно расположены в 5'- и иногда в 3'-нетранслируемых областях эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Данные области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей маскированный цитокин. Один применимый компонент, представляющий собой последовательность терминации транскрипции, представляет собой область полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота. *См.* W094/11026 и вектор экспрессии, раскрытый в ней.

Отбор и трансформация клеток-хозяев

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах в данном документе включают клетки высших эукариот, описанные в данном документе, включая клетки-хозяева позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (культуре тканей) стало обычной процедурой. Примеры пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих представляют собой линию клеток почки мартышки CV1, трансформированную SV40 (COS-7, CRL 1651 в ATCC); линию клеток почки эмбриона человека (293 или клетки 293, субклонированные для выращивания в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK, CCL 10 в ATCC); клетки яичника китайского хомяка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1, CCL 70 в ATCC); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, CRL-1587 в ATCC); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, CCL 2 в ATCC); клетки почки собаки (MDCK, CCL 34 в ATCC); клетки печени крыс линии Буффало (BEL 3A, CRL 1442 в ATCC); клетки легкого человека (W138, CCL 75 в ATCC); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, CCL51 в ATCC); клетки TRI (Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4 и линию клеток гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют с помощью вышеописанных векторов для экспрессии или клонирования для получения маскированного цитокина и культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных соответствующим образом для

стимуляции промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих необходимые последовательности.

h. Культивирование клеток-хозяев

Клетки-хозяева, применяемые для получения маскированных цитокинов по настоящему изобретению, можно культивировать в ряде сред. Коммерчески доступные среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла в модификации Дульбекко ((DMEM), Sigma) подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любые из сред, описанных в Ham et ah, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et ah, Anal. Biochem. 102:255 (1980), патентах США №№ 4767704; 4657866;

A,921162\ 4560655; или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195 или патенте США № Re. 30,985, можно применять в качестве сред для культивирования для клеток-хозяев. В любую из данных сред по мере необходимости можно добавлять гормоны и/или другие факторы роста (такие как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), соли (такие как хлорид натрия, соли кальция, магния и фосфат), буферы (такие как HEPES), нуклеотиды (такие как аденозин и тимидин), антибиотики (такие как лекарственное средство GENTAMYCIN™), микроэлементы (определяемые как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозу или эквивалентный источник энергии. Можно также включать любые другие добавки в соответствующих концентрациях, которые будут известны специалисту в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т. п., представляют собой условия, которые использовали ранее для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и они будут очевидны для специалиста средней квалификации в данной области техники.

i. Очистка маскированных цитокинов

При применении методик на основе рекомбинации маскированные цитокины могут продуцироваться внутриклеточно или могут непосредственно секретироваться в среду. Если маскированный цитокин продуцируется внутриклеточно, то в качестве первой стадии дебрис в виде частиц, либо клетки-хозяева, либо полученные в результате лизиса фрагменты можно удалять, например, посредством центрифугирования или ультрафильтрации. Если маскированный цитокин секретируется в среду, то надосадочные жидкости из таких систем экспрессии, как правило, сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка, например комплекта для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. На любой из вышеописанных стадий можно включать ингибитор протеазы, такой как PMSF, для ингибирования протеолиза, и можно включать антибиотики для предотвращения роста посторонних контаминирующих организмов.

Композицию на основе маскированного цитокина, полученную из клеток, можно подвергать очистке с применением, например, хроматографии на гидроксиапатите, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, при этом аффинная хроматография

представляет собой удобную методику. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа Fc-домена иммуноглобулина, при его наличии, который присутствует в маскированном цитокине. Белок А можно применять для очистки антител, которые получены на основе тяжелых цепей IgGl, IgG2 или IgG4 человека (Lindmark et ak, J. Immunol. Methods 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендован для всех изотипов мыши и для у3 человека (Guss et ak, EMBO J. 5:15671575 (1986)). Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, может представлять собой агарозу, однако доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают возможность применения более высоких скоростей потока и более короткого времени обработки, чем таковые, которых можно достичь при использовании агарозы. Если маскированный цитокин содержит CH3-домен, для очистки применима смола Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Филлипсбург, Нью-Джерси).

Также доступны другие методики для очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, HPLC с обращенной фазой, хроматография на кремнеземе, хроматография на гепарине, хроматография SEPHAROSE™ на анионообменной или катионообменной смоле (например, на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония, в зависимости от маскированного цитокина, подлежащего извлечению.

После любой предварительной стадии(стадий) очистки смесь, содержащую маскированный цитокин, представляющий интерес, и примеси, можно подвергать дополнительной очистке, например, посредством хроматографии гидрофобного взаимодействия при низком значении pH с применением буфера для элюирования при значении pH, составляющем от приблизительно 2,5 до 4,5, которую проводят при низких концентрациях соли (например, от приблизительно 0 М до 0,25 М соли).

В целом, различные методики получения маскированных цитокинов для применения в научно-исследовательской работе, тестирования и клинического применения хорошо известны из уровня техники, согласуются с вышеописанными методиками и/или сочтены целесообразными специалистом в данной области техники для конкретного маскированного цитокина, представляющего интерес.

5. КОМПОЗИЦИИ

В некоторых аспектах в данном документе также предусмотрены композиции, содержащие любые из маскированных цитокинов IL-12, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит любые из иллюстративных вариантов осуществления маскированного цитокина IL-12, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит димер любого из маскированных цитокинов IL-12, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит маскированный цитокин IL-12 и дополнительно содержит один или более из компонентов, подробно описанных ниже. Например, в некоторых вариантах осуществления композиция содержит один или более

фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ, стабилизаторов, буферов, консервантов, средств, регулирующих тоничность, неионогенных поверхностно-активных веществ или детергентов, или других терапевтических средств, или активных соединений, или их комбинаций. Различные варианты осуществления композиции иногда упоминаются в данном документе как составы.

Терапевтические составы получают для хранения посредством смешивания активного ингредиента, характеризующегося необходимой степенью чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Remington: The Science и Practice of Pharmacy, 20-е изд., Lippincott Williams & Wiklins, Pub., под ред. Gennaro, Филадельфия, Пенсильвания, 2000). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту, метионин, витамин Е, метабисульфит натрия; консерванты, изотонирующие средства, стабилизаторы, комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); хелатирующие средства, такие как EDTA, и/или неионогенные поверхностно-активные вещества.

Буферы можно применять для регуляции pH в диапазоне, который оптимизирует терапевтическую эффективность, в особенности, если стабильность является зависимой от pH. Буферы могут присутствовать в концентрациях, находящихся в диапазоне от приблизительно 50 мМ до приблизительно 250 мМ. Подходящие буферные средства для применения с настоящим изобретением включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли. Например, цитрат, фосфат, сукцинат, тартрат, фумарат, глюконат, оксалат, лактат, ацетат. Кроме того, буферы могут состоять из солей гистидина и триметиламина, как, например, Tris.

Консерванты можно добавлять для предупреждения роста микроорганизмов, и они, как правило, присутствуют в диапазоне от приблизительно 0,2% до 1,0% (вес/об.). Примеры подходящих консервантов, часто применяемых с терапевтическими средствами, включают октадецилдиметилбензилхлорид аммония; хлорид гексаметония; галогениды бензалкония (например, хлорид, бромид, иодид), хлорид бензетония; тимеросал, фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол, м-крезол, о-крезол, п-крезол, метил-п-гидроксибензоат, пропил-п-гидроксибензоат, 2-феноксиэтанол, бутил-п-гидроксибензоат, 2-фенилэтанол, этанол, хлорбутанол, тиомеросал, бронопол, бензойную кислоту, имидомочевину, хлоргексидин, дегидроацетат натрия, хлоркрезол, этил-п-гидроксибензоат и хлорфенезин (3р-хлорфеноксипропан-1,2-диол).

Средства, регулирующие тоничность, иногда известные как «стабилизаторы», могут присутствовать для коррекции или поддержания тоничности жидкости в композиции. При применении с крупными заряженными биомолекулами, такими как белки и антитела, они часто называются «стабилизаторами», поскольку они могут взаимодействовать с заряженными группами боковых цепей аминокислот, тем самым снижая потенциал

межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий.

Средства, регулирующие тоничность, могут присутствовать в любом количестве от приблизительно 0,1% до приблизительно 25% по весу или от приблизительно 1% до приблизительно 5% по весу с учетом относительных количеств других ингредиентов. В некоторых вариантах осуществления средства, регулирующие тоничность, включают многоатомные сахарные спирты, трехатомные или высшие сахарные спирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит и маннит.

Дополнительные вспомогательные вещества включают средства, которые могут служить в качестве одного или более из следующего: (1) объемообразующие средства, (2) средства, улучшающие растворимость, (3) стабилизаторы и (4) средства, предупреждающие денатурацию или адгезию к стенке контейнера. Такие вспомогательные вещества включают многоатомные сахарные спирты (перечисленные выше); аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, лизин, орнитин, лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т. д.; органические сахара или сахарные спирты, такие как сахароза, лактоза, лактит, трегалоза, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибит, миоинизитоза, миоинизит, галактоза, галактит, глицерин, циклиты (например, инозит), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстанавливающие средства, такие как мочевина, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, а-монотиоглицерин и тиосульфат натрия; белки с низкой молекулярной массой, такие как сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды (например, ксилозу, маннозу, фруктозу, глюкозу; дисахариды (например, лактозу, мальтозу, сахарозу); трисахариды, такие как раффиноза; и полисахариды, такие как декстрин или декстран.

Неионогенные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как «смачивающие средства») могут присутствовать для облегчения солюбилизации терапевтического средства, а также защиты терапевтического белка от агрегации, индуцированной перемешиванием, что также делает возможным избегание денатурации активного терапевтического белка или антитела при воздействии на состав напряжения поверхностного трения. Неионогенные поверхностно-активные вещества присутствуют в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/мл до приблизительно 1,0 мг/мл или от приблизительно 0,07 мг/мл до приблизительно 0,2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления неионогенные поверхностно-активные вещества присутствуют в диапазоне от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,1% вес/об., или от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% вес/об., или от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,025% вес/об.

Подходящие неионогенные поверхностно-активные вещества предусматривают полисорбаты (20, 40, 60, 65, 80 и т. д.), полиоксамеры (184, 188 и т. д.), полиолы PLURONIC®, TRITON®, моноэфиры полиоксиэтиленсорбитана (TWEEN®-20, TWEEN®-80 и т. п.), лауромакрогол 400, стеарат полиоксила 40, полиоксиэтилен-

гидрогенизированное касторовое масло 10, 50 и 60, моностеарат глицерина, сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Анионные детергенты, которые можно применять, включают лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия. Катионные детергенты включают хлорид бензалкония или хлорид бензетония.

Для того, чтобы составы применялись для введения in vivo, они должны быть стерильными. Состав можно сделать стерильным посредством фильтрации через мембраны для стерилизующей фильтрации. Терапевтические композиции в данном документе обычно помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например пакет или флакон для раствора для внутривенного введения с пробкой, которую можно проколоть иглой для подкожной инъекции.

Путь введения соответствует известным и принятым способам, например, введение осуществляется посредством одного или нескольких болюсных введений или посредством инфузии в течение длительного времени подходящим способом, например, посредством инъекции или инфузии подкожным, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным, внутриартериальным, внутриочаговым или внутрисуставным путем, посредством местного введения, ингаляции, или посредством способов, предусматривающих замедленное высвобождение или пролонгированное высвобождение.

Любой из маскированных цитокинов IL-12, описанных в данном документе, можно применять отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами, такими как в способах, описанных в данном документе. Термин «в комбинации с» охватывает два или более терапевтических средства (например, маскированный цитокин IL-12 и терапевтическое средство), которые включены в один и тот же или в отдельные составы. В некоторых вариантах осуществления термин «в комбинации с» относится к «одновременному» введению, в данном случае введение маскированного цитокина IL-12 по настоящему изобретению происходит одновременно с введением одного или более дополнительных терапевтических средств (например, в одно и то же время или в пределах одного часа между введением(введениями) маскированного цитокина IL-12 и введением одного или более дополнительных терапевтических средств). В некоторых вариантах осуществления термин «в комбинации с» относится к последовательному введению, в данном случае введение маскированного цитокина IL-12 по настоящему изобретению происходит до и/или после введения одного или более дополнительных терапевтических средств (например, более чем один час между введением(введениями) маскированного цитокина IL-12 и введением одного или более дополнительных терапевтических средств). Средства, предусмотренные в данном документе, включают без ограничения цитотоксическое средство, цитокин, средство, направленное на молекулу иммунной контрольной точки, средство, направленное на молекулу иммуностимулятора, средство, подавляющее рост, иммуностимулятор, противовоспалительное средство или противораковое средство.

Состав в данном документе может также содержать более чем одно активное

соединение, в зависимости от того, что необходимо для конкретного показания, в отношении которого осуществляется лечение, предпочтительно таковые с комплементарными видами активности, которые не влияют друг на друга нежелательным образом. В качестве альтернативы или дополнительно композиция может содержать цитотоксическое средство, цитокин, средство, направленное на молекулу иммунной контрольной точки или молекулу стимулятора, средство, подавляющее рост, иммуностимулятор, противовоспалительное средство или противораковое средство. Такие молекулы соответственно присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для предусмотренной цели.

Состав может быть представлен в любом подходящем состоянии, таком как жидкий состав, состав в твердом состоянии (лиофилизированный) или замороженный состав. Подходы для получения каждого из данных типов составов для терапевтического применения хорошо известны из уровня техники.

6. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

В данном документе предусмотрены способы лечения или предупреждения заболевания у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества любого маскированного цитокина IL-12, описанного в данном документе, или композиции на его основе. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы лечения или предупреждения заболевания у субъекта, включающие введение субъекту любой композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, у пациента-человека) был диагностирован рак или субъект подвержен риску развития такого нарушения. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы лечения или предупреждения заболевания у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества любого маскированного цитокина IL-12, описанного в данном документе, или композиции на его основе, где маскированный цитокин IL-12 активируется после расщепления ферментом. В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин IL-12 активируется в микроокружении опухоли. Маскированный цитокин IL-12 является терапевтически активным после его расщепления. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления активное средство представляет собой продукт расщепления.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая дозировка активного средства будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, как определено в данном документе, степени тяжести и течения заболевания, предназначения введения средства для профилактических или терапевтических целей, предшествующей терапии, клинического анамнеза субъекта и ответа на средство, а также усмотрения лечащего врача. Средство соответственно вводят субъекту однократно или в ходе ряда лечебных процедур.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, интервал между введениями маскированного цитокина IL-12, описанного в данном документе, составляет приблизительно одну неделю или больше. В некоторых вариантах

осуществления способов, описанных в данном документе, интервал между введениями маскированного цитокина IL-12, описанного в данном документе, составляет приблизительно два дня или больше, приблизительно три дня или больше, приблизительно четыре дня или больше, приблизительно пять дней или больше или приблизительно шесть дней или больше. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, интервал между введениями маскированного цитокина IL-12, описанного в данном документе, составляет приблизительно одну неделю или больше, приблизительно две недели или больше, приблизительно три недели или больше или приблизительно четыре недели или больше. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, интервал между введениями маскированного цитокина IL-12, описанного в данном документе, составляет приблизительно один месяц или больше, приблизительно два месяца или больше или приблизительно три месяца или больше. Как используется в данном документе, интервал между введениями относится к промежутку времени между одним введением маскированного цитокина IL-12 и следующим введением маскированного цитокина IL-12. Как используется в данном документе, интервал, составляющий приблизительно один месяц, включает четыре недели. В некоторых вариантах осуществления лечение включает несколько введений маскированного цитокина IL-12, где интервал между введениями может варьировать. Например, в некоторых вариантах осуществления интервал между первым введением и вторым введением составляет приблизительно одну неделю, и интервалы между последующими введениями составляют приблизительно две недели. В некоторых вариантах осуществления интервал между первым введением и вторым введением составляет приблизительно два дня, три дня, четыре дня, или пять дней, или шесть дней, и интервалы между последующими введениями составляют приблизительно одну неделю.

В некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин IL-12 вводят многократно в течение промежутка времени. Дозировка, которую вводят субъекту многократно, в некоторых вариантах осуществления может представлять собой одну и ту же дозировку для каждого введения, или в некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин могут вводить субъекту в двух или более разных дозировках. Например, в некоторых вариантах осуществления маскированный цитокин IL-12 изначально вводится в одной дозировке один или более раз и позже вводится во второй дозировке один или более раз, начиная с более позднего момента времени.

В некоторых вариантах осуществления маскированный полипептид IL-12, описанный в данном документе, вводится в фиксированной дозе. В некоторых вариантах осуществления маскированный полипептид IL-12, описанный в данном документе, вводят субъекту в дозировке, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 500 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления маскированный полипептид IL-12 вводят субъекту в дозировке, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 50 мг до приблизительно 75 мг, от приблизительно 75 мг до приблизительно 100 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 125 мг, от

приблизительно 125 мг до приблизительно 150 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 175 мг, от приблизительно 175 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 225 мг, от приблизительно 225 мг до приблизительно 250 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 275 мг, от приблизительно 275 мг до приблизительно 300 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 325 мг, от приблизительно 325 мг до приблизительно 350 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 375 мг, от приблизительно 375 мг до приблизительно 400 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 425 мг, от приблизительно 425 mt до приблизительно 450 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 475 мг или от приблизительно 475 мг до приблизительно 500 мг на дозу.

В некоторых вариантах осуществления маскированный полипептид IL-12, описанный в данном документе, вводят субъекту в дозировке, рассчитанной на основе веса или площади поверхности тела субъекта (BSA). В зависимости от типа и тяжести заболевания от приблизительно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг) маскированного полипептида IL-12 может быть начальной кандидатной дозировкой для введения пациенту, например, посредством либо одного или более раздельных введений, либо посредством непрерывной инфузии. Одна типичная суточная дозировка может находиться в диапазоне от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или больше в зависимости от факторов, упомянутых выше. Для повторных введений в течение нескольких дней или больше, в зависимости от состояния, лечение обычно будет продолжаться, пока не произойдет необходимое подавление симптомов заболевания. Одна иллюстративная дозировка маскированного полипептида IL-12 должна находиться в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Таким образом, одна или более доз, составляющих приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любая их комбинация), могут вводиться пациенту. В некоторых вариантах осуществления маскированный полипептид IL-12, описанный в данном документе, вводят субъекту в дозировке, составляющей от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 1,0 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления маскированный полипептид IL-12, описанный в данном документе, вводят субъекту в дозировке, представляющей собой любую из 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,5 мг/кг или 10,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления маскированный полипептид IL-12, описанный в данном документе, вводят субъекту в дозировке, составляющей приблизительно или по меньшей мере приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 1,0 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 2,0 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 3,0 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 3,5 мг/кг, приблизительно или по

меньшей мере приблизительно 4,0 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 4,5 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 5,0 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 5,5 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 6,0 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 6,5 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 7,0 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 7,5 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 8,0 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 8,5 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 9,0 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 9,5 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 10,0 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 15,0 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 20 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 30 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 40 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 50 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 60 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 70 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 80 мг/кг, приблизительно или по меньшей мере приблизительно 90 мг/кг или приблизительно или по меньшей мере приблизительно 100 мг/кг. Можно использовать любые значения частоты введения доз из описанных выше.

Способ лечения, предусмотренный в данном документе, представляет собой лечение нарушения или заболевания, такого как рак, с помощью любого из маскированных цитокинов IL-12 или композиций, описанных в данном документе. Нарушения или заболевания, поддающиеся лечению с помощью составов по настоящему изобретению, включают лейкоз, лимфому, рак головы и шеи, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, меланому, рак молочной железы, нейробластому, рак легкого, рак яичника, остеосаркому, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак печени, рак почки, рак кожи (например, карциному из клеток Меркеля) или рак яичка.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения рака посредством введения любых маскированных цитокинов IL-12 или композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения рака посредством введения любого маскированного цитокина IL-12 или композиции, описанных в данном документе, в комбинации с противораковым средством. Противораковое средство может представлять собой любое средство, способное уменьшать рост ракового образования, препятствовать репликации раковых клеток, непосредственно или опосредованно уничтожать раковые клетки, уменьшать метастазирование, уменьшать кровоснабжение опухоли или снижать выживаемость клеток. В некоторых вариантах осуществления противораковое средство выбрано из группы, состоящей из ингибитора PD-1, ингибитора EGFR, ингибитора HER2, ингибитора VEGFR, ингибитора CTLA-4, ингибитора BTLA, ингибитора B7H4, ингибитора B7H3, ингибитора CSFIR, ингибитора HVEM, ингибитора CD27, ингибитора KIR, ингибитора NKG2A, агониста NKG2D,

ингибитора TWEAK, ингибитора ALK, антитела, нацеленного на CD52, антитела, нацеленного на CCR4, ингибитора PD-L1, ингибитора KIT, ингибитора PDGFR, ингибитора BAFF, ингибитора HD AC, ингибитора лиганда VEGF, молекулы, нацеленной на CD19, молекулы, нацеленной на FOFR1, молекулы, нацеленной на DFF3, молекулы, нацеленной на DKK1, молекулы, нацеленной на MUC1, молекулы, нацеленной на MUG 16, молекулы, нацеленной на PSMA, молекулы, нацеленной на MSFN, молекулы, нацеленной на NY-ES0-1, молекулы, нацеленной на B7H3, молекулы, нацеленной на B7H4, молекулы, нацеленной на BCMA, молекулы, нацеленной на CD29, молекулы, нацеленной на CD151, молекулы, нацеленной на CD123, молекулы, нацеленной на CD33, молекулы, нацеленной на CD37, молекулы, нацеленной на CDH19, молекулы, нацеленной на CEA, молекулы, нацеленной на клаудин 18.2, молекулы, нацеленной на CFEC12A, молекулы, нацеленной на EGFRVIII, молекулы, нацеленной на EPCAM, молекулы, нацеленной на EPHA2, молекулы, нацеленной на FCRH5, молекулы, нацеленной на FLT3, молекулы, нацеленной на GD2, молекулы, нацеленной на глипикан 3, молекулы, нацеленной на gpA33, молекулы, нацеленной на GPRC5D, молекулы, нацеленной на IL-123R, молекулы, нацеленной на IL-1RAP, молекулы, нацеленной на MCSP, молекулы, нацеленной на RON, молекулы, нацеленной на ROR1, молекулы, нацеленной на STEAP2, молекулы, нацеленной на TfR, молекулы, нацеленной на CD166, молекулы, нацеленной на TPBG, молекулы, нацеленной на TROP2, ингибитора протеасом, ингибитора ABE, ингибитора CD30, ингибитора FLT3, ингибитора MET, ингибитора RET, ингибитора IL-1(3, ингибитора MEK, ингибитора ROS1, ингибитора BRAE, ингибитора CD38, ингибитора RANKE, ингибитора B4GALNT1, ингибитора SLAMF7, ингибитора IDH2, ингибитора mTOR, антитела, нацеленного на CD20, ингибитора BTK, ингибитора PI3K, ингибитора FLT3, ингибитора PARP, ингибитора CDK4, ингибитора CDK6, ингибитора EGFR, ингибитора RAF, ингибитора JAK1, ингибитора JAK2, ингибитора JAK3, ингибитора IL-6, ингибитора IL-17, ингибитора белка Smoothened, ингибитора IL-6R, ингибитора BCL2, ингибитора PTCH, ингибитора PIGF, ингибитора TGFB, агониста CD28, агониста CD3, агониста CD40, агониста GITR, агониста 0X40, агониста VISTA, агониста CD137, ингибитора LAG3, ингибитора TIM3, ингибитора TIGIT и ингибитора IL-12R.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения рака посредством введения любого маскированного цитокина IL-12, описанного в данном документе, в комбинации с противовоспалительным средством. Противовоспалительное средство может представлять собой любое средство, способное предупреждать, противодействовать, подавлять или иным образом снижать воспаление.

В некоторых вариантах осуществления противовоспалительное средство представляет собой ингибитор циклооксигеназы (COX). Ингибитор COX может представлять собой любое средство, которое ингибирует активность COX-1 и/или COX-2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор COX селективно ингибирует COX-1 (т. е. ингибитор COX ингибирует активность COX-1 больше, чем он ингибирует активность COX-2). В некоторых вариантах осуществления ингибитор COX селективно ингибирует

COX-2 (т. е. ингибитор COX ингибирует активность COX-2 больше, чем он ингибирует активность COX-1). В некоторых вариантах осуществления ингибитор COX ингибирует как COX-1, так и COX-2.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор COX представляет собой селективный ингибитор COX-1 и выбран из группы, состоящей из SC-560, FR122047, P6, мофезолака, TFAP, флурбипрофена и кетопрофена. В некоторых вариантах осуществления ингибитор COX представляет собой селективный ингибитор COX-2 и выбран из группы, состоящей из целекоксиба, рофекоксиба, мелоксикама, пироксикама, деракоксиба, парекоксиба, валдекоксиба, эторикоксиба, производного хромена, производного хромана, N-(2-циклогексилоксинитрофенил)метансульфонамида, парекоксиба, люмиракоксиба, RS 57067, T-614, BMS-347070, JTE-522, S-2474, SVT-2016, CT-3, ABT-963, SC-58125, нимесулида, флосулида, NS-398, L-745337, RWJ-63556, L-784512, дарбуфелона, CS-502, LAS-34475, LAS-34555, S-33516, диклофенака, мефенамовой кислоты и SD-8381. В некоторых вариантах осуществления ингибитор COX выбран из группы, состоящей из ибупрофена, напроксена, кеторолака, индометацина, аспирина, напроксена, толметина, пироксикама и меклофенамата. В некоторых вариантах осуществления ингибитор COX выбран из группы, состоящей из SC-560, FR122047, P6, мофезолака, TFAP, флурбипрофена, кетопрофена, целекоксиба, рофекоксиба, мелоксикама, пироксикама, деракоксиба, парекоксиба, валдекоксиба, эторикоксиба, производного хромена, производного хромана, N-(2-циклогексилоксинитрофенил)метансульфонамида, парекоксиба, люмиракоксиба, RS 57067, T-614, BMS-347070, JTE-522, S-2474, SVT-2016, CT-3, ABT-963, SC-58125, нимесулида, флосулида, NS-398, L-745337, RWJ-63556, L-784512, дарбуфелона, CS-502, LAS-34475, LAS-34555, S-33516, диклофенака, мефенамовой кислоты, SD-8381, ибупрофена, напроксена, кеторолака, индометацина, аспирина, напроксена, толметина, пироксикама и меклофенамата.

В некоторых вариантах осуществления противовоспалительное средство представляет собой ингибитор NF-κB. Ингибитор NF-κB может представлять собой любое средство, которое ингибирует активность пути NF-κB. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NF-κB выбран из группы, состоящей из ингибитора комплекса IKK, ингибитора разрушения IκB, ингибитора ядерной транслокации NF-κB, ингибитора ацетилирования p65, ингибитора связывания NF-κB с ДНК, ингибитора трансактивации NF-κB и ингибитора индукции p53.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплекса IKK выбран из группы, состоящей из TPCA-1, ингибитора активации NF-κB VI (BOT-64), BMS-345541, амлексанокса, SC-514 (GK-01140), IMD-0354 и IKK-16. В некоторых вариантах осуществления ингибитор разрушения IκB выбран из группы, состоящей из BAY-11-7082, MG-115, MG-132, лактацистина, эпоксомицина, партенолида, карфилзомиба и MLN-4924 (певонедистата). В некоторых вариантах осуществления ингибитор ядерной транслокации NF-κB выбран из группы, состоящей из JSH-23 и ролипрама. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ацетилирования p65 выбран из группы, состоящей из галловой

кислоты и анакардиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления ингибитор связывания NF-κB с ДНК выбран из группы, состоящей из GYY-4137, p-XSC, CV-3988 и простагландина E2 (PGE2). В некоторых вариантах осуществления ингибитор трансактивации NF-κB выбран из группы, состоящей из LY-294002, вортманнина и месаламина. В некоторых вариантах осуществления ингибитор индукции p53 выбран из группы, состоящей из хинакрина и флавопиридола. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NF-κB выбран из группы, состоящей из TPCA-1, ингибитора активации NF-κB VI (BOT-64), BMS-345541, амлексанокса, SC-514 (GK-01140), IMD-0354, IKK-16, BAY-11-7082, MG-115, MG-132, лактацистина, эпоксомицина, партенолида, карфилзомиба, MLN-4924 (певонедистата), JSH-23, ролипрама, галловой кислоты, анакардиновой кислоты, GYY-4137, p-XSC, CV-3988, простагландина E2 (PGE2), LY-294002, вортманнина, месаламина, хинакрина и флавопиридола.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения рака посредством введения любого маскированного цитокина IL-12 или композиции, описанных в данном документе, в комбинации с противораковым терапевтическим белком. Противораковый терапевтический белок может представлять собой любой терапевтический белок, способный уменьшать рост ракового образования, препятствовать репликации раковых клеток, непосредственно или опосредованно уничтожать раковые клетки, уменьшать метастазирование, уменьшать кровоснабжение опухоли или снижать выживаемость клеток. Иллюстративные противораковые терапевтические белки могут быть представлены в форме антитела или его фрагмента, производного антитела, биспецифического антитела, Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), слитого белка или привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE). В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения или предупреждения рака посредством введения любого маскированного цитокина IL-2 или композиции, описанных в данном документе, в комбинации с клетками CAR-NK (естественными киллерами).

7. ИЗДЕЛИЯ ИЛИ НАБОРЫ

В другом аспекте предусмотрено изделие или набор, которые содержат любой маскированный цитокин IL-12, описанный в данном документе. Изделие или набор могут дополнительно содержать инструкции по применению цитокинов в способах по настоящему изобретению. Таким образом, в определенных вариантах осуществления изделие или набор содержат инструкции по применению маскированного цитокина в способах лечения или предупреждения нарушения (например, рака) у индивидуума, включающих введение индивидууму эффективного количества маскированного цитокина. Например, в определенных вариантах осуществления изделие или набор содержат инструкции по применению маскированного полипептида IL-12 в способах лечения или предупреждения нарушения (например, рака) у индивидуума, включающих введение индивидууму эффективного количества маскированного полипептида IL-12. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека. В

некоторых вариантах осуществления индивидуум страдает от заболевания, выбранного из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, рака головы и шеи, колоректального рака, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, меланомы, рака молочной железы, нейробластомы, рака легкого, рака яичника, остеосаркомы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака печени, рака почек, рака кожи или рака яичка.

Изделие или набор могут дополнительно содержать контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как однокамерные или двухкамерные шприцы), пробирки и пакеты для внутривенного (IV) введения. Контейнер может быть изготовлен из ряда материалов, таких как стекло или пластик. В контейнере содержится состав. В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой лиофилизированный состав. В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой замороженный состав. В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой жидкий состав.

Изделие или набор могут дополнительно содержать этикетку или листок-вкладыш в упаковку, которые находятся на контейнере или ассоциированы с ним, в которых могут быть указаны инструкции по восстановлению и/или применению состава. На этикетке или в листке-вкладыше в упаковку может быть дополнительно указано, что состав является применимым или предназначен для подкожного, внутривенного или других путей введения для лечения или предупреждения нарушения (например, рака) у индивидуума. Контейнер, в котором содержится состав, может представлять собой флакон для одноразового применения или флакон для многоразового применения, который обеспечивает возможность повторных введений восстановленного состава. Изделие или набор могут дополнительно содержать второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель. Изделие или набор могут дополнительно содержать другие материалы, необходимое с коммерческой, терапевтической и пользовательской точки зрения, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листки-вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает наборы для единицы для однократного введения дозы. Такие наборы содержат контейнер с жидким составом на основе терапевтического цитокина, включающий как

однокамерные, так и многокамерные предварительно заполненные шприцы. Иллюстративные предварительно заполненные шприцы доступны от Vetter GmbH, Равенсбург, Германия.

Изделие или набор в данном документе необязательно дополнительно содержат контейнер, содержащий второй лекарственный препарат, где маскированный цитокин представляет собой первый лекарственный препарат, и где изделие или набор на этикетке или в листке-вкладыше в упаковку дополнительно содержат инструкции для лечения субъекта с помощью второго лекарственного препарата в эффективном количестве.

В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрено изделие или набор, содержащие составы, описанные в данном документе, для введения в устройстве для

аутоинъекций. Аутоинъектор можно описать как устройство для инъекций, которое после активации будет доставлять его содержимое без необходимости дополнительного действия со стороны пациента или лица, осуществляющего введение. Они особенно подходят для самостоятельного введения терапевтических составов, где скорость доставки должна быть постоянной, и время доставки составляет более чем несколько мгновений.

8. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, предполагается, что вся специальная терминология, условные обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в данном документе, имеют такое же значение, какое обычно понимает специалист средней квалификации в области техники, к которой относится заявляемый объект. В некоторых случаях терминам с общеизвестными значениями дано определение в данном документе для ясности и/или удобства отсылки, и включение таких определений в данный документ не следует обязательно толковать как свидетельствующее о наличии существенного отличия от того, что обычно понимается в данной области техники.

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными композициями или биологическими системами, которые, безусловно, могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевается как ограничивающая. Используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают соответствующие формы множественного числа, если в содержании четко не указано иное. Таким образом, например, упоминание «полипептида IL-12» необязательно включает комбинацию двух или более таких полипептидов и т. п.

Используемый в данном документе термин «приблизительно» относится к обычному диапазону погрешностей для соответствующего значения, хорошо известного специалисту в данной области техники. Ссылка на «приблизительно» по отношению к значению или параметру в данном документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены непосредственно на данное значение или параметр.

Понятно, что аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, включают аспекты и варианты осуществления, в которых используются выражения «включающие», «состоящие из» и «по сути состоящие из».

Используемый в данном документе термин «и/или» относится к любому из объектов, любой комбинации объектов или всем из объектов, с которыми ассоциирован данный термин. Например, предполагается, что фраза «A, B и/или C» охватывает каждый из следующих вариантов осуществления: A, B и C; A, B или C; A или B; A или C; B или C; A и B; A и C; B и C; A и B или C; B и A или C; C и A или B; A (по отдельности); B (по отдельности) и C (по отдельности).

Термин «антитело» включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (включая полноразмерные антитела, которые содержат Fc-область иммуноглобулина), композиции на основе антител с полиэпитопной специфичностью, полиспецифические

антитела (например, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы, а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')2 и Fv). Термин «иммуноглобулин» (Ig) используется взаимозаменяемо с термином «антитело» в данном документе.

Термин «диатела» относится к малым фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (VL), в одной и той же полипептидной цепи (VH-VL).

Основной 4-цепочечный блок антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Антитело IgM состоит из 5 основных гетеротетрамерных блоков наряду с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и содержит 10 антигенсвязывающих сайтов, тогда как антитела IgA содержат от 2 до 5 основных 4-цепочечных блоков, которые могут полимеризоваться с образованием поливалентных агрегатов, в комбинации с J-цепью. В случае IgG молекулярная масса 4-цепочечного блока обычно составляет приблизительно 150000 дальтон. Каждая L-цепь соединена с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи соединены друг с другом одной или более дисульфидными связями в зависимости от изотипа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также содержит равномерно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь содержит на N-конце вариабельный домен (VH), за которым следуют три константных домена (CH) для каждой из *a*- и y-цепей и четыре CH-домена для изотипов p и s. Каждая L-цепь содержит на N-конце вариабельный домен (VL), за которым следует константный домен на его другом конце. VL выравнивается с VH и CL выравнивается с первым константным доменом тяжелой цепи (CHI). Полагают, что конкретные аминокислотные остатки образуют область стыка между вариабельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Попарное соединение VH и VL приводит к образованию одного антигенсвязывающего сайта. Структуру и свойства разных классов антител см., например, в Basic and Clinical Immunology, 8-е издание, Daniel P. Sties, Abba I. Terr и Tristram G. Parsolw (ред.), Appleton & Lange, Норуолк, Коннектикут, 1994, стр. 71 и глава 6.

L-цепь от любого вида позвоночных может относиться к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (CH) иммуноглобулины могут относиться к разным классам или изотипам. Существуют пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, содержащие тяжелые цепи, обозначенные как a, 8, e, y и p соответственно. Классы y и *a* дополнительно подразделяются на подклассы на основании относительно незначительных различий в последовательности CH и функции, например, у людей экспрессируются следующие подклассы: IgGl, IgG2, IgG3, IgG4, IgAl и IgA2. Антитела IgGl могут существовать в виде множества полиморфных вариантов, называемых аллотипами (обзор в Jefferis и Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любые из которых

являются подходящими для применения в настоящем изобретении. Часто встречающиеся аллотипические варианты в человеческих популяциях представляют собой таковые, обозначенные буквами a, f, n, z.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано, отделено и/или извлечено из компонента среды его продуцирования (например, естественным путем или с применением рекомбинации). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид не находится в ассоциации со всеми другими компонентами из среды его продуцирования. Примесные компоненты среды его продуцирования, например, таковые, которые образуются из рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые, как правило, создают помехи при научно-исследовательских, диагностических или терапевтических путях применения антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах осуществления полипептид подвергают очистке (1) до более чем 95% по весу антитела, что определяют, например, с помощью метода Лоури, и в некоторых вариантах осуществления до более чем 99% по весу; (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности посредством применения секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности посредством SDS-PAGE в невосстанавливающих или восстанавливающих условиях с применением окраски кумасси синим или серебром. Выделенное антитело включает антитело in situ в рекомбинантных клетках, так как по меньшей мере один компонент естественной среды антитела не будет присутствовать. Однако, как правило, выделенный полипептид или антитело получают посредством по меньшей мере одной стадии очистки.

Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по сути гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризаций, амидирований), которые могут присутствовать в незначительных количествах. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела характеризуются C-концевым отщеплением в тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются на C-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления отщепление C-конца обеспечивает удаление C-концевого лизина из тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела характеризуются N-концевым отщеплением в тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются на N-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления усеченные формы моноклональных антител можно получать посредством методик на основе рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными на один антигенный сайт. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела являются высокоспецифичными,

будучи направленными на несколько антигенных сайтов (такие как биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело). Определение «моноклональный» указывает на характеристику антитела как полученного из по сути гомогенной популяции антител, и его не следует толковать как требующее получения антитела посредством какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела, подлежащие применению в соответствии с настоящим изобретением, можно получать посредством ряда методик, включающих, например, гибридомный способ, способы на основе рекомбинантной ДНК, технологии фагового дисплея и технологии получения антител человека или антител, подобных им, у животных, которые содержат части или все локусы иммуноглобулина человека или гены, кодирующие последовательности иммуноглобулина человека.

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» или «целое антитело» используются взаимозаменяемо и относятся к антителу в его по сути интактной форме в отличие от фрагмента антитела. В частности, целые антитела включают таковые с тяжелой и легкой цепями, включающими Fc-область. Константные домены могут представлять собой константные домены с нативной последовательностью (например, константные домены человека с нативной последовательностью) или варианты их аминокислотной последовательности. В некоторых случаях интактное антитело может иметь одну или более эффекторных функций.

«Фрагмент антитела» содержит часть интактного антитела, такую как антигенсвязывающая область, и/или вариабельная область интактного антитела, и/или константная область интактного антитела. Примеры фрагмента антитела включают Fc-область антитела, часть Fc-области или часть антитела, содержащую Fc-область. Примеры антигенсвязывающих фрагментов антител включают доменные антитела (dAb), фрагменты Fab, Fab', F(ab')2 и Fv; диатела; линейные антитела (см. патент США № 5641870, пример 2; Zapata et ah, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Антитела с одной тяжелой цепью или антитела с одной легкой цепью могут быть сконструированы или, в случае тяжелой цепи, могут быть выделены от представителей семейства верблюдовых, акулы, из библиотек или от мышей, сконструированных для продуцирования молекул с одной тяжелой цепью.

Расщепление антител папаином обеспечивало получение двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых «Fab-фрагментами», и остаточного «Fc-фрагмента», где обозначение отражает способность легко кристаллизоваться. Fab-фрагмент состоит из всей L-цепи наряду с доменом вариабельной области H-цепи (VH) и первого константного домена одной тяжелой цепи (CHI). Каждый Fab-фрагмент является моновалентным с точки зрения связывания антигена, т. е. он содержит один антигенсвязывающий сайт. Обработка антитела пепсином приводит к получению одного крупного F(ab')2-фрагмента, который грубо соответствует двум Fab-фрагментам, соединенным дисульфидными связями, характеризующимся разной антигенсвязывающей активностью, и еще способен к поперечной сшивке с антигеном. Fab'-фрагменты

отличаются от Fab-фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на карбокси-конце домена CHI, включающих один или более остатков цистеина из шарнирной области антитела. В данном документе Fab'-SH представляет собой обозначение для Fab', где остаток(остатки) цистеина константных доменов несут свободную тиольную группу. Изначально F(ab')2-фрагменты антител получали в виде пар Fab'-фрагментов, которые содержат остатки цистеина шарнирной области между ними. Также известны другие химические сочетания фрагментов антител. Fc-фрагмент содержит карбокси-концевые части обеих H-цепей, скрепленные вместе посредством дисульфидных связей. Эффекторные функции антител определяются последовательностями и гликаном в Fc-области, области, которая также распознается Fc-рецепторами (FcR), встречающимися на определенных типах клеток.

«Процентная (%) идентичность аминокислотной последовательности» по отношению к эталонной полипептидной последовательности определяется как процентная доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности и не принимая во внимание любые консервативные замены в качестве части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процентной идентичности аминокислотной последовательности может достигаться различными путями, которые находятся в пределах уровня знаний специалиста в данной области техники, например, с применением общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % идентичности аминокислотной последовательности заданной аминокислотной последовательности A по отношению к аминокислотной последовательности B, с ней или по сравнению с ней (что в качестве альтернативы можно перефразировать как «заданная аминокислотная последовательность A, которая характеризуется определенным % идентичности аминокислотной последовательности или предусматривает таковой по отношению к заданной аминокислотной последовательности B, с ней или по сравнению с ней») рассчитывают следующим образом:

100 умножить на дробь X/Y,

где X представляет собой число аминокислотных остатков, учтенных как идентичные совпадения с последовательностью при выравнивании A и B в данной программе, и где Y представляет собой общее число аминокислотных остатков в B. Будет понятно, что если длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, % идентичности аминокислотной последовательности A по отношению к B не будет равен % идентичности аминокислотной

последовательности B по отношению к A.

Выражение «эффекторные функции» антитела относится к тем видам биологической активности, которые обусловлены Fc-областью (Fc-областью с нативной последовательностью или Fc-областью с вариантной аминокислотной последовательностью) антитела и варьируют в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание Clq и комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; обеспечение снижения количества рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточных рецепторов) и активацию B-клеток.

Используемый в данном документе термин «аффинность связывания» относится к силе нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, цитокина) и ее партнера по связыванию (например, рецептора цитокина). В некоторых вариантах осуществления аффинность связывающего белка (например, цитокина) обычно может быть представлена константой диссоциации (Kd). Аффинность можно измерять посредством общепринятых способов, известных из уровня техники, включающих таковые, описанные в данном документе.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды цитокина, описанные в данном документе, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которую идентифицируют и отделяют от меньшей мере одной примесной молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциирована в среде, в которой она была получена. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота не находится в ассоциации со всеми компонентами, ассоциированными со средой ее продуцирования. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды и полипептиды цитокина в данном документе, находятся в форме, отличной от формы или условий, в которых они встречаются в природе. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, таким образом, отличаются от нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды и полипептиды цитокина в данном документе, естественным путем существующей в клетках.

Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, которая позволяет биологической активности активного ингредиента быть эффективной и которая не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав.

Такие составы являются стерильными.

Используемый в данном документе термин «носители» включает фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, которые являются нетоксичными в отношении клетки или млекопитающего, подвергающихся их воздействию в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой забуференный водный раствор с определенным уровнем pH. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфатный,

цитратный и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту; полипептид с низкой молекулярной массой (менее чем приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™.

Используемый в данном документе термин «лечение» относится к клиническому вмешательству, разработанному для изменения естественного течения у индивидуума или в клетке, подвергающихся лечению во время протекания клинического патологического процесса. Необходимые эффекты лечения включают снижение скорости прогрессирования заболевания, смягчение или облегчение статуса заболевания и ремиссию или улучшение прогноза. Индивидуум успешно подвергается «лечению», например, если один или более симптомов, ассоциированных с нарушением (например, неопластическим заболеванием), уменьшаются или устраняются. Например, индивидуум успешно подвергается «лечению», если лечение приводит к повышению качества жизни у лиц, страдающих от заболевания, снижению дозы других лекарственных препаратов, требуемых для лечения заболевания, снижению частоты рецидивов заболевания, снижению степени тяжести заболевания, замедлению развития или прогрессирования заболевания и/или увеличению продолжительности выживаемости индивидуумов.

Используемые в данном документе выражения «совместно с» или «в комбинации с» относятся к введению одного средства для лечения в дополнение к другому средству для лечения. Таким образом, выражения «совместно с» или «в комбинации с» относятся к введению одного средства для лечения до, во время или после введения другого средства для лечения индивидууму.

Используемый в данном документе термин «предупреждение» предусматривает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у индивидуума. Индивидуум может являться предрасположенным, восприимчивым к нарушению или может подвергаться риску развития нарушения, но у него еще не было диагностировано нарушение. В некоторых вариантах осуществления маскированные цитокины, описанные в данном документе, применяют для замедления развития нарушения.

Как используется в данном документе, индивидуум, «подвергающийся риску» развития нарушения, может иметь или не иметь выявляемое заболевание или симптомы заболевания и может демонстрировать или не демонстрировать выявляемое заболевание или симптомы заболевания до способов лечения, описанных в данном документе. Выражение «подвергающийся риску» означает, что индивидуум имеет один или более

факторов риска, которые представляют собой измеримые параметры, которые коррелируют с развитием заболевания, как известно из уровня техники. Индивидуум, имеющий один или более из данных факторов риска, характеризуется более высокой вероятностью развития нарушения, чем индивидуум без одного или более из данных факторов риска.

Выражение «эффективное количество» относится к по меньшей мере количеству, эффективному, в необходимых дозировках и в течение необходимых промежутков времени, для достижения необходимого или указанного эффекта, включающего терапевтический или профилактический результат.

Эффективное количество может обеспечиваться в виде одного или более введений. «Терапевтически эффективное количество» представляет собой по меньшей мере минимальную концентрацию, требуемую для обеспечения измеримого улучшения в отношении конкретного нарушения. Терапевтически эффективное количество в данном документе может варьировать в соответствии с факторами, такими как статус заболевания, возраст, пол и вес пациента, а также способность антитела вызывать необходимый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество может также представлять собой количество, при котором любые токсические или вредные эффекты маскированного цитокина перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами. Выражение «профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному, в необходимых дозировках и в течение необходимых промежутков времени, для достижения необходимого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическая доза применяется у субъекта до заболевания или на ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество может быть меньше, чем терапевтически эффективное количество.

Выражение «продолжительное» введение относится к введению лекарственного препарата(препаратов) в постоянном режиме по сравнению с краткосрочным режимом таким образом, чтобы поддерживать начальный терапевтический эффект (активность) в течение длительного промежутка времени. «Прерывистое» введение представляет собой лечение, которое осуществляется не последовательно без перерыва, а является циклическим по своей природе.

Как используется в данном документе, «индивидуум» или «субъект» представляют собой млекопитающее. В контексте лечения «млекопитающее» включает людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных зоопарков, спортивных животных или домашних питомцев, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и т. д. В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект представляют собой человека.

9. ПРИМЕРЫ

Более полное понимание настоящего изобретения будет достигаться с помощью ссылки на следующие примеры. Однако их не следует толковать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены лишь для иллюстративных целей и что с их

учетом специалистам в данной области техники будут предложены различные модификации или изменения, и они подлежат включению в сущность и сферу действия данной заявки, а также объема прилагаемой формулы изобретения.

Несмотря на то, что в некоторых примерах описывается конструирование, получение и/или тестирование «маскированных» версий конструкции полипептида IL-2, в некоторых примерах также используются исходные «немаскированные» версии конструкции полипептида IL-2, например, для сравнения, или другие конструкции, которые предусматривают один или более из компонентов, описанных в данном документе, которые тестируют в качестве контролей для сравнения. Соответственно, описание, например, тестирования, выполняемого в отношении конструкций маскированного полипептида IL-2, не обязательно означает, что немаскированные версии конструкции также не подвергались тестированию.

Пример 1. Конструирование маскированных полипептидов IL-2

Маскированный полипептид IL-2 получают согласно сведениям в данном документе. В последующих примерах некоторые эксперименты включают применение конструкций маскированного полипептида IL-2 в форме мономера, и некоторые эксперименты включают применение конструкций маскированного IL-2 в форме димера, такого как димер, образованный посредством дисульфидных связей, соединяющих две копии одинаковой конструкции маскированного полипептида (гомодимер), или гетеродимер, образованный двумя разными полипептидами (*см., например*, таблицу 5).

Получают конструкции маскированного полипептида IL-2, которые предусматривают полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент, маскирующий компонент и домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, такой как антитело или его фрагмент (например, Fc-область, тяжелая цепь и/или легкая цепь). Также получают некоторые конструкции полипептида IL-2, которые предусматривают полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент, соединенные с доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, которые при этом не предусматривают маскирующего компонента. Некоторые из конструкций также предусматривают линкер, который содержит расщепляемый пептид и соединяет маскирующий компонент с полипептидом IL-2 или его функциональным фрагментом, в результате чего получают активируемую конструкцию маскированного полипептида IL-2. Некоторые из конструкций также предусматривают линкер, который соединяет полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент с доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни. Некоторые из конструкций также предусматривают линкер, который соединяет полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент с маскирующим компонентом. Конструкции маскированного полипептида IL-2, которые не предусматривают расщепляемого пептида в линкере, который соединяет полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент с маскирующим компонентом, также называются неактивируемыми конструкциями маскированного полипептида IL-2 или неактивируемыми конструкциями полипептида IL-2, поскольку они не предусматривают расщепляемого пептида. Структура и композиция иллюстративных конструкций

полипептида IL-2 представлены в таблице 3.

Таблица 3

Номер конструкции	Структура (направление от N- к C-концу)
AK032	H-C
AK035	H-C

Также получают конструкции маскированного полипептида IL-2, которые предусматривают полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент, первый маскирующий компонент, второй маскирующий компонент и домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, такой как альбумин, антитело или его фрагмент (например, Fc-область, тяжелая цепь и/или легкая цепь), альбумин-связывающий пептид, IgG-связывающий пептид или полиаминокислотная последовательность. Некоторые из конструкций также предусматривают линкер, который соединяет первый маскирующий компонент с полипептидом IL-2 или его функциональным фрагментом. Некоторые из конструкций также предусматривают линкер, который соединяет второй маскирующий компонент с полипептидом IL-2 или его функциональным фрагментом. Некоторые из конструкций предусматривают расщепляемый пептид в линкере, соединяющем первый маскирующий компонент с полипептидом IL-2 или его функциональным фрагментом, и/или в линкере, соединяющем второй маскирующий компонент с полипептидом IL-2 или его функциональным фрагментом, в результате чего получают активируемую конструкцию маскированного полипептида IL-2. Некоторые из конструкций также предусматривают линкер, соединяющий второй маскирующий компонент с доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни. Конструкции маскированного полипептида IL-2, которые не предусматривают расщепляемого пептида в любом из линкеров, которые соединяют полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент с первым маскирующим компонентом или вторым маскирующим компонентом, также называются неактивируемыми конструкциями маскированного полипептида IL-2 или неактивируемыми конструкциями полипептида IL-2, поскольку они не предусматривают расщепляемого пептида. Структура и композиция иллюстративных конструкций полипептида IL-2 представлены в таблице 4.

Таблица 4

Номер конструкции	Структура (направление от N- к C-концу)
AK041	H-L1-MM1-L2-C-L3-MM2

Также получают конструкции маскированного полипептида IL-2, которые предусматривают полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент, маскирующий компонент, первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, антитело или его фрагмент (например, Fc-область, тяжелую цепь и/или легкую цепь). Маскирующий компонент соединен с первым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни,

полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент соединены со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержат модификации, способствующие ассоциации первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни. В одном иллюстративном варианте осуществления маскирующий компонент соединен с первым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент соединены со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержат модификации, способствующие ассоциации первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни. В одном иллюстративном варианте осуществления конструкции немаскированного полипептида IL-2 вариант осуществления предусматривает полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент, соединенные с первым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и предусматривает второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, где полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент соединены с первым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни. Некоторые из конструкций также предусматривают линкер, который соединяет маскирующий компонент с первым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и/или линкер, который соединяет полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни. Первый и второй домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни, некоторых из конструкций также соединены. В некоторых конструкциях первый и второй домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни, некоторых из конструкций соединены посредством линкера. Некоторые из конструкций предусматривают расщепляемый пептид в линкере, соединяющем маскирующий компонент с первым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и/или в линкере, соединяющем полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, в результате чего получают активируемую конструкцию маскированного полипептида IL-2. Конструкции маскированного полипептида IL-2, которые не предусматривают расщепляемого пептида ни в линкере, который соединяет полипептид IL-2 или его функциональный фрагмент со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, ни в линкере, который соединяет маскирующий компонент с первым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, также называются неактивируемыми конструкциями маскированного полипептида IL-2 или неактивируемыми конструкциями полипептида IL-2, поскольку они не предусматривают расщепляемого пептида. Структура и композиция иллюстративных конструкций полипептида IL-2 представлены в таблице 5.

Таблица 5

Номер конструкции	Структура (направление от N- к C-концу)
AK081	H-L1-C
	H
AK109	H-L1-MM
	H-C
AK110	H-L1-MM
	H-C
AK111	H-L1-C
	H-L1-MM
AK165	H-L1-C
	H
AK166	H-L1-C
	H-L1-MM
AK167	H-L1-C
	H
AK168	H-L1-C
	H-L1-MM
AK189	H-L1-C
	H-L1-MM
AK190	H-L1-C
	H-L1-MM
AK191	H-L1-C
	H-L1-MM
AK192	H-L1-C
	H-L1-MM
AK193	H-L1-C
	H-L1-MM
AK197	H-L1-C
	H-L1-MM
AK203	H-L1-C
	H-L1-MM
AK209	H-L1-C
	H-L1-MM

AK210	H-L1-C
	H-L1-MM
AK211	H-L1-C
	H-L1-MM
AK215	H-L1-C
	H-L1-MM
AK216	H-L1-C
	H-L1-MM
AK218	H-L1-C
	H-L1-MM
AK219	H-L1-C
	H-L1-MM
AK220	H-L1-C
	H-L1-MM
AK223	H-L1-C
	H-L1-MM
AK235	H-L1-C
	H
AK253	H-L1-C
	H
AK304	H-L1-C
	H
AK305	H-L1-C
	H-L1-MM
AK306	H-L1-C
	H
AK307	H-L1-C
	H-L1-MM
AK308	H-L1-C
	H
AK309	H-L1-C
	H-L1-MM
AK310	H-L1-C
	H

AK311	H-L1-C
	H-L1-MM
AK312	H-L1-C
	H
AK313	H-L1-C
	H-L1-MM
AK314	H-L1-C
	H
AK315	H-L1-C
	H-L1-MM
AK316	H-L1-C
	H-L1-MM

Пример 2. Определение характеристик маскированного IL-2 in vitro

Характеристики конструкций маскированного полипептида IL-2, полученных в примере 1, определяют с применением нескольких клеточных и функциональных анализов in vitro.

Получение

Плазмидами, кодирующими конструкции (например, конструкции маскированного полипептида IL-2), трансфицировали либо клетки Expi293 (Life Technologies A14527), либо клетки HEK293-6E (Национальный научно-исследовательский совет США; NRC). Процедуры трансфекции выполняли с применением 1 мг общей ДНК с применением PEIpro (Polyplus Transfection, 115-100) в соотношении 1:1 с общей ДНК. Каждую из ДНК и PEI добавляли к 50 мл среды OptiMem (Life Technologies 31985088) и подвергали стерилизующей фильтрации. ДНК и PEI объединяли в течение 10 минут и добавляли к клеткам Expi293 при плотности клеток, составляющей 1,8-2,8×10^6 клеток/мл или 0,85-1,20×10^6 клеток/м для клеток expi293 или клеток HEK293 соответственно, и жизнеспособности, составляющей по меньшей мере 95%. Трансфекцию HEK293-6E выполняли при плотности клеток и жизнеспособности, составляющей по меньшей мере 95%, согласно тому же протоколу, который применялся для процедур трансфекции Expi293. Через 5-7 дней клетки осаждали посредством центрифугирования при 3000 x g и надосадочную жидкость фильтровали через мембрану с размером пор 0,2 мкм. Смолу с белком A (CaptivA, Repligen CA-PRI-0005) добавляли к отфильтрованной надосадочной жидкости и инкубировали в течение по меньшей мере 2 часов при 4°C со встряхиванием. Смолу укладывали в колонку, промывали с помощью 15 объемов колонки 20 мМ цитрата, pH 6,5, и затем промывали с помощью 15 объемов колонки 20 мМ цитрата, 500 мМ хлорида натрия, pH 6,5. Связанный белок элюировали из колонки с помощью 20 мМ цитрата, 100 мМ NaCl, pH 2,9.

Титр (мг/л) полученных иллюстративных конструкций, включая исходные (например, немаскированные) и маскированные конструкции, представлен в таблице 6 ниже.

Таблица 6

Конструкция ID	Титр (мг/л)		Конструкция ID	Титр (мг/л)
AK032	5,8		AK312	154
AK035	16,7		AK313	81,2
AK081	23,5			
AK111	12,7			
AK165	13,5			
AK166	17,1			
AK167	56,4			
AK168	36,1			
AK203	83,2			
AK209	27,3			
AK211	43,8			
AK235	35,9			
AK253	41,4			
AK304	19,9			
AK305	53,2			
AK306	29,3			
AK307	62,9			
AK314	60			
AK315	59,8			
AK316	69,2			
AK308	74,5			
AK309	90,8			
AK310	44			
AK311	64,9			

Анализ методом SDS-PAGE

Для анализа методом SDS-PAGE образцы белка получали с помощью 4x буфера для образцов Лэммли (BioRad, номер по каталогу 1610747). Для восстановленных образцов добавляли 0,1 M Bond Breaker TCEP Solution (Thermo Scientific 77720) и образцы нагревали в течение 5 минут при 65°C. Белки загружали в 12-луночный NuPage 4-12% Bis-Tris Protein

Gel (Invitrogen NP0322BOX) при загрузке 4 мкг белка на лунку. Гель окрашивали с применением SimplyBlue SafeStain (Invitrogen LC6065).

Как изображено на ФИГ. 4, анализ методом SDS-PAGE выполняли на проточных (FT) образцах (т. е. белках, которые не связывались с колонкой с белком A) и элюированных (E) образцах (т. е. белках, которые связывались с колонкой с белком A и элюировались из нее) после получения и очистки иллюстративных конструкций (AK304, AK305, AK307, AK308, AK309, AK310, AK311, AK312, AK313, AK314 и AK315). Эти иллюстративные данные демонстрируют, что конструкции, описанные в данном документе, можно успешно получать и очищать.

Биологические анализы с использованием репортерного гена

Биологические анализы с использованием репортерного гена выполняют на конструкциях маскированного полипептида IL-2 наряду с немаскированными исходными конструкциями или другими контролями для наблюдения активации нисходящего пути, такого как путь JAK-STAT.

В некоторых исследованиях клетки HEK-Blue IL-2 (Invivogen) с репортерным геном применяли для тестирования активации пути JAK-STAT в соответствии со следующим способом. Клетки HEK-Blue IL-2 пересева 6 (p6) (97% живых) промывали с помощью 2x среды для анализа (DMEM+10% инактивированной нагреванием FBS), высевали в 3 планшета при 5e4 клеток/лунка в 150 мкл среды для анализа и оставляли в среде для анализа на приблизительно 2 часа для обеспечения адгезии к планшету. Каждую тестируемую конструкцию разбавляли до 300 пМ в среде для анализа, затем разбавляли 1:2 далее по планшету. Добавляли 50 мкл каждого разбавления для конечной стартовой концентрации, составляющей 75 пМ. Надосадочную жидкость клеток HEK-Blue IL-2 собирали через 24 часа, инкубировали с Quantiblue (180 мкл+20 мкл надосадочной жидкости) и 3 лунками/планшет среды для анализа при 37°C в течение 1 часа. Поглощение считывали с применением Biotek Neo2 при 625 нм.

В некоторых исследованиях клетки CTLL2 применяли для тестирования активации пути JAK-STAT в соответствии со следующим способом. Клетки CTLL2 высевали при 40000 клеток на лунку в RPMI с 10% FBS. Добавляли разбавления конструкций, представляющих интерес, и инкубировали при 37 градусах. Через 6 часов добавляли реагент Bio-Glo и измеряли люминесценцию с помощью планшет-ридера BioTek Synergy Neo2.

Связывание рецептора

Оценивают связывание конструкций маскированного полипептида IL-2, полученных в примере 1. В некоторых экспериментах для конструкций маскированного полипептида IL-2 планшеты для ELISA покрывают субъединицей рецептора, такой как IL-2Rα (также называемая CD25), IL-2Rβ (также называемая CD122) или IL-2Rγ (также называемая CD132) или их комбинации. Обеспечивают связывание разбавлений конструкций маскированного полипептида IL-2 с субъединицей(субъединицами) рецептора и выявляют с применением антитела к huFc-HRP для выявления. Связывание

конструкций маскированного полипептида IL-2 определяют в условиях с расщеплением протеазой и без него.

Связывание рецептора на поверхности клетки

Оценивают связывание рецептора на поверхности клетки с конструкциями маскированного полипептида IL-2, полученными в примере 1. Обеспечивают связывание разбавлений конструкций маскированного полипептида IL-2 с лимфоцитами периферической крови или клетками культур ткани, такими как клетки CTLL2, и выявляют посредством сортировки клеток с активацией флуоресценцией (FACS) с применением антитела к huFc-FITC или к альбумину-FITC для выявления. Связывание конструкций маскированного полипептида IL-2 определяют в условиях с расщеплением протеазой и без него.

Аффинность связывания рецептора

Для исследований методом SPR, в ходе которых тестируют связывание конструкций маскированного и немаскированного полипептида IL-2, сенсорные чипы Reichert на основе карбоксиметилированного декстрана с гидрогелевой поверхностью покрывали конструкцией, представляющей интерес (например, конструкцией маскированного полипептида IL-2 или конструкцией немаскированного полипептида IL-2), и иммобилизировали ее при 30 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия, pH 5,0, посредством сочетания по аминогруппе с EDC и NHS. Получали разбавления CD25-Fc или Fc-CD122 в PBST (CD25: 16 нМ, 8 нМ, 4 нМ, 2 нМ, 1 нМ, и CD122: 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ, 31,25 нМ). С применением 4-канального прибора для SPR Reichert обеспечивали протекание разбавлений CD25 или CD122 над чипами с иммобилизованной конструкцией для определения скорости ассоциации при 25 градусах С. При достижении равновесия (примерно 3 минуты) проточный буфер заменяли на PBST для определения скоростей диссоциации в течение 6 минут. После каждого анализа чип восстанавливали с помощью 10 мМ глицина, pH 2,0.

На ФИГ. 5A-5D изображена эффективность мутаций в IL-2, которые предотвращают связывание с его альфа-рецептором, определенная с применением анализа методом SPR, в ходе которого тестировали связывание иллюстративной конструкции маскированного полипептида IL-2 (AK168) с CD25-Fc. На ФИГ. 5A изображено взаимодействие между AK168 и CD25-Fc, на ФИГ. 5B изображено взаимодействие между AK168, активированным MMP, и CD25-Fc, и на ФИГ. 5C изображено взаимодействие между контролем, представляющим собой рекомбинантный IL-2 человека (rhIL-2), и CD25-Fc. На ФИГ. 5D представлена таблица сводных данных, полученных для константы ассоциации (ka), константы диссоциации (kd), равновесной константы диссоциации (KD), а также значения Chi2 и U-значения для каждого взаимодействия. Данные результаты демонстрируют, что иллюстративная конструкция маскированного полипептида IL-2 (AK168) не демонстрировала поддающегося выявлению связывания с CD25-Fc, тогда как контроль, представляющий собой rhIL-2 дикого типа, демонстрировал поддающееся выявлению связывание.

На ФИГ. 6A-6D изображено маскирование IL-2 в отношении его бета-рецептора, а также восстановление связывания после активации протеазой, определенное с применением анализа методом SPR, в ходе которого тестировали связывание иллюстративной конструкции маскированного полипептида IL-2 (AK111) с CD122-Fc. На ФИГ. 6A изображено взаимодействие между AK111 и CD122-Fc, на ФИГ. 6B изображено взаимодействие между AK111, активированным MMP, и CD122-Fc, и на ФИГ. 6C изображено взаимодействие между контролем, представляющим собой рекомбинантный IL-2 человека (rhIL-2), и CD122-Fc. На ФИГ. 6D представлена таблица сводных данных, полученных для константы ассоциации (ka), константы диссоциации (kd), равновесной константы диссоциации (KD), а также значения Chi2 и U-значения для каждого взаимодействия. Данные результаты демонстрируют, что иллюстративная конструкция маскированного полипептида IL-2 (AK111) не демонстрировала поддающегося выявлению связывания с CD122-Fc, если она не была активирована протеазой, тогда как контроль, представляющий собой rhIL-2, демонстрировал поддающееся выявлению связывание. Дополнительные иллюстративные данные SPR приведены в таблице 7 для различных тестируемых конструкций, включая маскированные и немаскированные конструкции. Для некоторых структур, где это применимо, KD определяли для конструкции, подвергавшейся или не подвергавшейся предшествующему расщеплению протеазой.

Таблица 7

Конструкция	**KD для CD25 (без расщепления протеазой)**	**KD для CD122 (без расщепления протеазой)**	**KD для CD122 (после расщепления протеазой)**
rhIL2	0,878 нМ	124 нМ	N/A
AK032	1,76 нМ	260 нМ	N/A
AK035	Связывание не выявлено	110 нМ	N/A
AK081	0,875 нМ	347 нМ	N/A
AK109	1,67 нМ	Связывание не выявлено	118 нМ
AK110	0,911 нМ	Связывание не выявлено	195 нМ
AK111	0,4 нМ	Связывание не выявлено	235 нМ
AK168	Связывание не выявлено	Не определено	175 нМ

AK215	Связывание не выявлено		
AK216	Связывание не выявлено		
AK218	Слабое связывание		
rhIL2	0,878 нМ	124 нМ	N/A
AK032	1,76 нМ	260 нМ	N/A
AK035	Связывание не выявлено	110 нМ	N/A

Расщепление

Скорость расщепления конструкций маскированного полипептида IL-2 оценивают посредством проведения анализов связывания рецептора, описанных выше, после инкубации конструкций маскированного пептида IL-2 в присутствии или в отсутствие протеазы, и где протеазу, при ее наличии, инактивируют в различные моменты времени, например, посредством добавления EDTA. Скорость расщепления также оценивают с применением электрофореза на полиакриламидном геле (PAGE) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и анализов общей массы и карты пептидов посредством масс-спектрометрии. Скорость расщепления также оценивают с применением анализа ex vivo, в ходе которого конструкции маскированного полипептида IL-2 подвергают воздействию лимфоцитов периферической крови человека, мыши или макака-крабоеда, или здоровой ткани человека, или опухолевой ткани человека.

Для некоторых исследований активации протеазы MMP10 разбавляли до 50 нг/мкл в буфере для расщепления с помощью MMP и активировали с помощью 1 мМ APMA в течение 2 ч при 37ºC. 5 мкл протеазы (всего 250 нг) из активированной протеазы инкубировали с 1 мкМ конструкций маскированного цитокина (например, конструкций маскированного полипептида IL-2) и инкубировали при 37 градусах в течение 2 часов. Расщепление оценивали посредством SDS-PAGE с применением гелей для белков AnykD™ Criterion™ TGX Stain-Free™. Сходный подход используют для тестирования расщепления другими протеазами.

На ФИГ. 7A изображена иллюстративная структура маскированного полипептида IL-2 до (слева) и после (справа) расщепления протеазой, такой как протеаза, ассоциированная с микроокружением опухоли. На ФИГ. 7B изображен анализ методом SDS-PAGE иллюстративной конструкции маскированного полипептида IL-2, которую инкубировали в отсутствие (левый ряд) или в присутствии (правый ряд) протеазы MMP10.

Пролиферация

Оценивают пролиферацию линий клеток культур ткани, восприимчивых к IL-2, таких как CTLL2, YT, TF1B, LGL, HH и CT6, после обработки конструкциями маскированного полипептида IL-2, полученными в примере 1. Для экспериментов,

включающих конструкции маскированного полипептида IL-2, клетки высевают в 96-луночные планшеты для культур ткани в среды без IL-2 на 2-4 часа и затем обрабатывают конструкциями маскированного полипептида IL-2 в различных концентрациях. После инкубации при 37 градусах С в течение 24-48 часов определяют количество клеток посредством добавления MTS, аламарового синего, люциферазы или сходного метаболического реагента для выявления, и колориметрические, флуоресцентные или люциферазные сигналы выявляют с помощью спектрофотометрического планшет-ридера.

Также оценивают пролиферацию иммунных клеток после обработки конструкциями маскированного полипептида IL-2, полученными в примере 1. Мононуклеарные клетки периферической крови человека, мыши или макака-крабоеда (PBMC) обрабатывают конструкциями в различных концентрациях, и пролиферацию типов клеток, таких как естественные клетки-киллеры (NK), CD8+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки и/или клетки Treg, определяют посредством окрашивания для определенного типа клеток и анализа посредством сортировки клеток с активацией флуоресценцией (FACS). В некоторых экспериментах некоторые PBMC обрабатывают контролями для сравнения. В некоторых экспериментах некоторые PBMC обрабатывают алдеслейкином в качестве контроля для обработки маскированным полипептидом IL-2. В некоторых экспериментах конструкции маскированного полипептида IL-2 тестируют в условиях с расщеплением (например, активацией) протеазой и без него. В некоторых экспериментах NK-клетки окрашивают как CD45+ CD3- CD56+, CD8+ Т-клетки окрашивают как CD45+ CD3+ CD8+, CD4+ Т-клетки окрашивают как CD45+ CD3+ CD4+ CD25-, и клетки Treg окрашивают как CD45+ CD3+ CD4+ CD25+ FOXP3+. В некоторых экспериментах PBMC обрабатывают в течение периода времени, составляющего пять дней. В некоторых экспериментах PBMC также окрашивают с помощью Ki67, маркера пролиферации клеток. В некоторых экспериментах PBMC метят с помощью CFSE (Sigma-Aldrich) перед обработкой и пролиферацию измеряют посредством определения степени разбавления CFSE. В некоторых экспериментах каждую конструкцию, а также алдеслейкин и/или другие контроли вводят в одной или более концентрациях, например в одной или более концентрациях в диапазоне от 0,0001 нМ до 500 нМ.

Активация STAT5

Также оценивают активацию передатчика сигнала и активатора транскрипции 5 (STAT5) после обработки конструкциями маскированного полипептида IL-2, полученными в примере 1. PBMC обрабатывают конструкциями в течение указанного промежутка времени и затем непосредственно фиксируют для сохранения статуса фосфорилирования белков, таких как STAT5. В некоторых экспериментах некоторые PBMC обрабатывают контролями для сравнения. В некоторых экспериментах некоторые PBMC обрабатывают алдеслейкином в качестве контроля для обработки маскированным полипептидом IL-2. В некоторых экспериментах конструкции маскированного полипептида IL-2 тестируют в условиях с расщеплением (например, активацией) протеазой и без него. В некоторых экспериментах PBMC обрабатывают в течение 10 минут, 15 минут, 20 минут или 25 минут.

В некоторых экспериментах каждую конструкцию, а также алдеслейкин и/или другие контроли вводят в одной или более концентрациях, например в одной или более концентрациях в диапазоне от 0,0001 нМ до 500 нМ. В некоторых экспериментах фиксированные и пермеабилизированные PBMC затем окрашивают с помощью антитела, специфичного в отношении фосфорилированного STAT5 (фосфо-STAT5), и анализируют посредством проточной цитометрии. В некоторых экспериментах измеряют уровень общего STAT5 и уровень фосфорилированного STAT5. Статус фосфо-STAT5 для определенных типов клеток, таких как NK-клетки, CD8+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки и/или клетки Treg, определяют посредством окрашивания для выявления конкретного типа клеток. В некоторых экспериментах NK-клетки окрашивают как CD45+ CD3- CD56+, CD8+ Т-клетки окрашивают как CD45+ CD3+ CD8+, CD4+ Т-клетки окрашивают как CD45+ CD3+ CD4+ CD25-, и клетки Treg окрашивают как CD45+ CD3+ CD4+ CD25+ FOXP3+.

Также оценивают активацию STAT5 в линиях клеток мыши, таких как клетки CTLL-2, после обработки конструкциями маскированного полипептида IL-2, полученными в примере 1. В некоторых экспериментах некоторые клетки CTLL-2 обрабатывают контролями для сравнения. В некоторых экспериментах некоторые клетки CTLL-2 обрабатывают алдеслейкином в качестве контроля для обработки маскированным полипептидом IL-2. В некоторых экспериментах конструкции маскированного полипептида IL-2 тестируют в условиях с расщеплением (например, активацией) протеазой и без него. В некоторых экспериментах клетки CTLL-2 обрабатывают в течение 10 минут, 15 минут, 20 минут или 25 минут и затем фиксируют для сохранения статуса фосфорилирования белков, таких как STAT5. В некоторых экспериментах каждую конструкцию, а также алдеслейкин и/или другие контроли вводят в одной или более концентрациях. В некоторых экспериментах измеряют уровни общего STAT5 и фосфорилированного STAT5.

В некоторых исследованиях уровни внутриклеточной активации STAT5 (сигнал pSTAT5), индуцированной IL-2, определяли следующим способом. Замороженные PBMC человека размораживали на водяной бане и добавляли к 39 мл предварительно нагретых сред (среда RPMI1640 плюс 10% FBS, 1% P/S, 1% NEA), центрифугировали и восстанавливали в средах при 10E6 клеток/мл. Клетки высевали при 5E5 клеток на лунку в 96-луночный планшет. IL-2 (например, rhIL-2 или иллюстративную конструкцию, содержащую полипептид IL-2), разбавленный в среде, добавляли к каждой лунке и инкубировали при 37°C в течение 20 мин. Затем клетки фиксировали с помощью 200 мкл/лунка буфера для фиксации (eBiosciences) при 4°C в течение ночи. После центрифугирования фиксированные клетки повторно суспендировали в 200 мкл холодного буфера BD Phosflow и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. После двукратного промывания клеток их обрабатывали с помощью Biolegend Human TruStain FcX (2,5 мкл в общем объеме 50 мкл на образец в буфере для окрашивания) в течение 5 мин на льду. Добавляли антитела для окрашивания; 5 мкл pSTAT5-APC (pY694, BD), 10 мкл CD56-BV421 (5.1H11, Biolegend), 10 мкл CD4-PerCP/Cy5.5 (A161A1, Biolegend) и 10 мкл CD3-

FITC (UCHT1, Biolegend) и инкубировали в течение 30 мин на льду при защите от попадания света. Клетки промывали 2 раза, и повторно суспендировали, и анализировали посредством проточной цитометрии.

На ФИГ. 8A-8D изображены результаты исследований активации STAT5, описанных выше, с применением иллюстративных конструкций AK032, AK035, AK041 или rhIL-2 в качестве контроля. Уровни активации STAT5 (%) показаны для NK-клеток, CD8+ T-клеток, эффекторных T-клеток (Teff) и регуляторных T-клеток (Treg). Конструкции AK032 и AK035 предусматривают полипептид IL-2, соединенный с Fc-доменом, и конструкция AK041 предусматривает полипептид IL-2, соединенный с доменом CD25 и доменом CD122. Как показано, сконструированные конструкции полипептида IL-2 в некоторых вариантах осуществления могут снижать активацию клеток Treg, одновременно сохраняя или усиливая активацию CD8+ T-клеток и NK-клеток.

На ФИГ. 9A-9C изображены результаты исследований активации STAT5, описанных выше, с применением иллюстративных конструкций AK081 и AK032. Тестировали конструкцию AK081 с предшествующим воздействием MMP10 и без него. Также тестировали изотипический контроль, а также отрицательный контроль без обработки с помощью IL-2. Уровни активации STAT5 (%) показаны для NK-клеток, CD8+ T-клеток и CD4+ T-клеток. Конструкции AK032 и AK081 предусматривают полипептид IL-2, соединенный с Fc-доменом, и конструкция AK081 предусматривает расщепляемый пептид в линкере, соединяющем полипептид IL-2 с Fc-доменом. Как показано, немаскированная мономерная конструкция полипептида IL-2 AK081 стимулирует активацию STAT5 в PBMC с активацией протеазой или без нее подобно немаскированной димерной конструкции полипептида IL-2 AK032.

На ФИГ. 10A-10D изображены результаты исследований активации STAT5, описанных выше, осуществленных с применением иллюстративных конструкций AK081 и AK111, а также контролей, которые включали rhIL-2 и антитело к RSV. Также тестировали контроль без обработки. Конструкция AK111 представляет собой иллюстративную конструкцию маскированного полипептида IL-2, которая предусматривает форму полипептида IL-2 дикого типа (за исключением мутации C125A). Как показано на ФИГ. 10A-10D, конструкция маскированного полипептида IL-2 AK111 демонстрировала сниженную активацию STAT5 по сравнению с конструкцией немаскированного полипептида IL-2 AK081. На ФИГ. 10D представлена EC50 (пМ) и данные по кратности изменения для конструкций AK081, AK111, а также контроля, представляющего собой rhIL-2.

На ФИГ. 11A-11D изображены результаты исследований активации STAT5, описанных выше, осуществленных с применением иллюстративных конструкций AK167 и AK168, а также контролей, которые включали rhIL-2 и антитело к RSV. Также тестировали контроль без обработки. Конструкция AK168 представляет собой иллюстративную конструкцию маскированного полипептида IL-2, которая предусматривает мутантную форму полипептида IL-2, которая обеспечивает устранение или снижение связывания

CD25. Конструкция AK167 представляет собой исходную немаскированную форму конструкции AK168, которая предусматривает такой же мутантный полипептид IL-2. Как показано на ФИГ. 11A-11C, немаскированная конструкция AK167 демонстрировала сниженную активацию STAT5 по сравнению с контролем, представляющим собой rhIL-2, и конструкция маскированного полипептида IL-2 AK168 не индуцировала поддающейся выявлению активации STAT5. На ФИГ. 11D представлена EC50 (пМ) и данные по кратности изменения для конструкций AK167, AK168, а также контроля, представляющего собой rhIL-2. EC50 конструкции AK168 не поддавалась выявлению (n.d.).

На ФИГ. 12A-12D изображены результаты исследований активации STAT5, описанных выше, осуществленных с применением иллюстративных конструкций AK165 и AK166, а также изотипического контроля и контроля, представляющего собой IL-2-Fc, которые предварительно подвергались (+ MMP10) или не подвергались воздействию протеазы MMP10. Конструкция AK166 представляет собой иллюстративную конструкцию маскированного полипептида IL-2, которая предусматривает форму полипептида IL-2 дикого типа (за исключением мутации C125A). Конструкция AK165 представляет собой исходную немаскированную форму конструкции AK166, которая предусматривает такой же полипептид IL-2. Обозначения, показанные на ФИГ. 12A, также применимы для ФИГ. 12B, и обозначения, показанные на ФИГ. 12C, также применимы для ФИГ. 12D. Как показано на ФИГ. 12A-12D, активация STAT5 была значительно снижена в случае конструкции маскированного AK166 (без расщепления протеазой), но восстанавливалась до уровней, сходных с таковыми для контроля, представляющего собой IL2-Fc, после воздействия активирующей протеазой MMP10.

На ФИГ. 13A-13C изображены результаты исследований активации STAT5, описанных выше, осуществленных с применением иллюстративных конструкций AK109 и AK110, а также изотипического контроля и контроля, представляющего собой IL-2-Fc, которые предварительно подвергались (+ MMP10) или не подвергались воздействию протеазы MMP10. Конструкции AK109 и AK110 представляют собой иллюстративные конструкции маскированного полипептида IL-2, которые предусматривают домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни, содержащие разные мутации, способствующие гетеродимеризации. Обозначения, показанные на ФИГ. 13B, также применимы для ФИГ. 13A. Как показано на ФИГ. 13A-13C, активация STAT5 была значительно сниженной в случае маскированной конструкции AK109 и AK110 (без расщепления протеазой), но значительно повышалась до уровней, достигающих таковые для контроля, представляющего собой IL2-Fc, после воздействия активирующей протеазой MMP10.

На ФИГ. 14A-14D изображены результаты исследований активации STAT5, описанных выше, с применением конструкций AK211, AK235, AK253, AK306, AK310, AK314 и AK316, а также контроля, представляющего собой rhIL-2. Это предусматривает конструкции, которые представляют собой исходные немаскированные конструкции (AK235, AK253, AK306, AK310, AK314), которые содержат различные мутации, которые

модулируют связывание CD25. На ФИГ. 14D представлены данные по EC50 для каждой из тестируемых конструкций, а также контроля, представляющего собой rhIL-2.

На ФИГ. 15A-15D изображены результаты исследований активации STAT5, описанных выше, с применением конструкций AK081, AK167, AK216, AK218, AK219, AK220 и AK223, которые были активированы протеазой, а также контроля, представляющего собой rhIL-2. Также тестировали контроль без обработки. Это предусматривает конструкции маскированного полипептида IL-2 (AK216, AK218, AK219, AK220 и AK223), которые содержат различные мутации, которые модулируют связывание CD25. Конструкции предварительно подвергали воздействию активирующей протеазой до тестирования их способности активировать STAT5. На ФИГ. 15D представлены данные по EC50 для каждой из тестируемых конструкций, а также контроля, представляющего собой rhIL-2.

На ФИГ. 16A-16C изображены результаты исследований активации STAT5, описанных выше, осуществленных с применением конструкций AK081, AK189, AK190 и AK210, а также контроля, представляющего собой антитело к RSV. Это предусматривает конструкции маскированного полипептида IL-2 (AK189, AK190, AK210), которые содержат полипептид IL-2, содержащий мутацию C125A, и содержат такую же расщепляемую пептидную последовательность (RAAAVKSP), но при этом содержат разные линкерные последовательности вследствие различий в аминокислотных остатках на N-конце последовательности, расщепляемой протеазой. Обозначения, показанные на ФИГ. 16A, также применимы для ФИГ. 16B и 16C.

На ФИГ. 17A-17C изображены результаты исследований активации STAT5, описанных выше, осуществленных с применением конструкций AK167, AK191, AK192 и AK193, а также контроля, представляющего собой антитело к RSV. Это предусматривает конструкции маскированного полипептида IL-2 (AK189, AK190, AK210), которые содержат полипептид IL-2, содержащий мутации R38A, F42A, Y45A, E62A и C125A, и содержат такую же расщепляемую пептидную последовательность (RAAAVKSP; SEQ ID NO: 27), но при этом содержат разные линкерные последовательности вследствие различий в аминокислотных остатках на N-конце последовательности, расщепляемой протеазой. Обозначения, показанные на ФИГ. 17A, также применимы для ФИГ. 17B и 17C.

Пример 3. Определение характеристик маскированного IL-2 in vivo

Фармакокинетика

Фармакокинетику конструкций маскированного полипептида IL-2 и полученных в примере 1 оценивают in vivo с применением моделей на мышах.

Мышей обрабатывают конструкциями внутривенно или подкожно, и концентрацию конструкции в плазме крови измеряют с течением времени. В некоторых экспериментах некоторых мышей обрабатывают контролями для сравнения. В некоторых экспериментах некоторых мышей обрабатывают алдеслейкином в качестве контроля для обработки маскированным полипептидом IL-2. В некоторых экспериментах у мышей, которых подвергают обработке, имеются опухоли. В некоторых экспериментах у мышей, которых

подвергают обработке, нет опухолей. В некоторых экспериментах мышей обрабатывают конструкциями и кровь собирают в различные моменты времени в течение курса обработки, что может включать сбор крови до начала обработки и ее переработку с получением плазмы крови. В некоторых экспериментах кровь собирают в различные моменты времени в течение двух недель, трех недель или четырех или более недель обработки. В некоторых экспериментах измеряют среднюю концентрацию вводимых конструкций, а также алдеслейкина и/или других контролей в плазме крови. Конструкции маскированного полипептида IL-2 выявляют в образцах плазмы крови после разбавления в PBS Tween с помощью ELISA, специфичных в отношении IL-2 и Fc человека, и количественно определяют с применением стандартной кривой, полученной для каждой конструкции. Процентную долю полноразмерных и расщепленных конструкций определяют посредством вестерн-блоттинга с помощью антител к huFc-HRP и huIL-2-HRP и спектрометрии общей массы и массы пептида.

Фармакокинетику конструкций маскированного полипептида IL-2 в опухолях также оценивают in vivo с применением моделей на мышах. Мышей, у которых имеются опухоли, обрабатывают конструкциями внутривенно или подкожно и оценивают концентрацию конструкции в опухолях мышей. В некоторых экспериментах некоторых мышей обрабатывают контролями для сравнения. В некоторых экспериментах некоторых мышей обрабатывают алдеслейкином в качестве контроля для обработки маскированным полипептидом IL-2. Опухоли анализируют в отношении присутствия конструкций, а также присутствия конкретных протеаз. В некоторых экспериментах опухоли анализируют в отношении присутствия и процентной доли полноразмерных и расщепленных конструкций.

Некоторые фармакокинетические исследования выполняли согласно следующему способу. Самок мышей C57BL/6 приобретали в Charles River Laboratories, и их возраст составлял 8-10 недель на момент начала исследования. Опухолевые клетки MC38 (5 x10^5 клеток на мышь) вводили посредством подкожной инъекции в правый бок каждой мыши. При достижении размера опухоли, составляющего ~100 мм^3 (день 0), мыши получали однократную внутривенную дозу конструкции, представляющей интерес, составляющую 2 мг/кг (например, конструкции немаскированного исходного полипептида IL-2, конструкции маскированного полипептида IL-2 или конструкции нерасщепляемого маскированного полипептида IL-2) в PBS. Исследуемые конструкции включают, например, AK032, AK081, AK111, AK167, AK168, AK191, AK197, AK203, AK209 и AK211. Плазму крови собирали через 5 мин в дни 1, 2 и 5 после введения дозы. Уровни лекарственного средства определяли с применением ELISA с использованием антитела к IgG человека (клон M1310G05, Biolegend) в качестве антитела захвата и различных вторичных антител. Конъюгированные с HRP или биотином антитела к IgG человека (ab97225, Abcam) или CD122 (клон 9A2, Ancell) и IL-2 (Poly5176, Biolegend) для выявления использовали для выявления уровней общего и нерасщепленного лекарственного средства соответственно.

На ФИГ. 18A-18D описаны результаты фармакокинетических исследований,

проводившихся, как описано выше, у мышей, несущих опухоль, с применением конструкций AK032, AK081, AK111, AK167 и AK168, а также контроля, представляющего собой антитело к RSV. На ФИГ. 18A представлено упрощенное изображение структуры каждой из тестируемых конструкций. Как указано, AK111 и AK168 представляют собой иллюстративные конструкции маскированного полипептида IL-2. Конструкции AK167 и AK168 предусматривают мутации (R38A, F42A, Y45A и E62A), которые обеспечивают устранение или снижение связывания с CD25. На ФИГ. 18A показаны уровни Fc в плазме крови (мкг/мл), определенные посредством выявления IgG человека, на ФИГ. 18C показаны уровни Fc-CD122 в плазме крови (мкг/мл), определенные посредством выявления CD122 человека, и на ФИГ. 18D показаны уровни Fc-IL2 в плазме крови (мкг/мл), определенные посредством выявления IL-2 человека.

На ФИГ. 19A-19D описаны результаты фармакокинетических исследований, проводившихся, как описано выше, у мышей, несущих опухоль, с применением конструкций AK167, AK191 AK197, AK203, AK209 и AK211, а также контроля, представляющего собой антитело к RSV. На ФИГ. 19A представлено упрощенное изображение структуры каждой из тестируемых конструкций. Как указано, AK168, AK191, AK197, AK203 и AK209 представляют собой иллюстративные конструкции маскированного полипептида IL-2, каждая из которых содержит отличающуюся последовательность расщепляемого пептида в линкере, соединяющем полипептид IL-2 с доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни. На ФИГ. 19B показаны уровни Fc в плазме крови (мкг/мл), определенные посредством выявления IgG человека, на ФИГ. 19C показаны уровни Fc-IL2 в плазме крови (мкг/мл), определенные посредством выявления IL-2 человека, и на ФИГ. 19D показаны уровни Fc-CD122 в плазме крови (мкг/мл), определенные посредством выявления CD122 человека. Как показано на ФИГ. 19B, 19C и 19D, уровни Fc, уровни Fc-IL2 и уровни Fc-CD122 в плазме крови являются сходными для тестируемых конструкций маскированного полипептида IL-2.

Исследование биологической активности у мышей

Биологическую активность in vivo конструкций маскированного полипептида IL-2, полученных в примере 1, оценивают in vivo с применением моделей на мышах, таких как мыши C57BL/6. Мышей обрабатывают конструкциями и оценивают биологическую активность in vivo. В некоторых экспериментах некоторых мышей обрабатывают контролями для сравнения. В некоторых экспериментах некоторых мышей обрабатывают алдеслейкином в качестве контроля для обработки маскированным полипептидом IL-2. В некоторых экспериментах у мышей, которых подвергают обработке, имеются опухоли. В некоторых экспериментах у мышей, которых подвергают обработке, нет опухолей. В некоторых экспериментах оценивают дозозависимое размножение иммунных клеток у мышей. В некоторых экспериментах мышей обрабатывают различными дозами конструкции, алдеслейкина или другого контроля. В некоторых экспериментах мышей обрабатывают в течение двух недель. Кровь собирают у мышей в различные моменты времени и затем окрашивают с применением антител к маркерам иммунных клеток,

представляющим интерес. В некоторых экспериментах также определяют долгосрочную кинетику пролиферации и размножения определенных типов циркулирующих клеток, таких как CD8+ Т-клетки, NK-клетки и клетки Treg, а также отношение CD8+ Т-клеток и NK-клеток к CD4+ CD25+ FoxP3+ клеткам Treg. В некоторых экспериментах мышей оценивают в отношении транссудации, например, посредством оценки на наличие отека и лимфоцитарной инфильтрации в определенных органах, таких как легкое и печень, что определяется с помощью сырого веса и гистологической картины органа.

В некоторых исследованиях транссудацию оценивали с целью оценки потенциальных эффектов, связанных с токсичностью, опосредованных видами терапии на основе IL-2, посредством выполнения следующего способа. Исследования токсичности при многократном введении доз проводили с использованием самок мышей C57BL/6, которых приобретали в Charles River Laboratories, возраст которых составлял 8-10 недель и которые весили 18-22 граммов на момент начала исследования. Группы из 5 мышей получали ежедневные внутрибрюшинные инъекции конструкций маскированного и немаскированного IL-2 в PBS ежедневно в течение 4 или 5 дней. Тестируемые конструкции включали AK081, AK111, AK167 и AK168. Контрольное антитело также вводили в качестве контроля. Через два часа после введения последней дозы все мыши получали внутривенную инъекцию 0,1 мл 1% Evans Blue (Sigma, № по кат. E2129) в PBS. Через два часа после введения Evans Blue мышей подвергали анестезии и перфузии 10 Ед./мл гепарина в PBS. Селезенку, легкое и печень собирали и фиксировали в 3 мл 4% PFA в течение 2 дней при 4°C перед измерением поглощения надосадочной жидкости при 650 нм с помощью NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) в качестве индикатора транссудации Evans Blue. Фиксированные органы заключали в парафин, выполняли срезы и окрашивали гематоксилином и эозином. Патоморфологические исследования и количественное определение выполняли в NovoVita Histopath Laboratory, LLC. (Оллстон, Массачусетс) в соответствии со стандартными процедурами. На ФИГ. 25A-50D изображены результаты исследования in vivo, описанного выше, для оценки транссудации при применении иллюстративных конструкций маскированного полипептида IL-2 AK111 и AK168, а также конструкций немаскированного полипептида IL-2 AK081 и AK167 и контроля, представляющего собой антитело к RSV. На ФИГ. 25A показана процентная доля (%) потери веса тела, и на ФИГ. 25B, 25C и 25D показан вес в граммах для печени, легкого и селезенки соответственно для каждого.

Транссудацию, как указано посредством измерения степени транссудации красителя в ткани, также оценивали для конструкций AK081, AK111, AK167 и AK168 наряду с контролем, представляющим собой антитело к RSV, где результаты показаны на ФИГ. 26A и 26B для печени и легкого соответственно. Степень транссудации красителя измеряли на основании поглощения при 650 нм.

Транссудацию, определяемую посредством измерения степени периваскулярной инвазии мононуклеарных клеток в печень и легкое, также оценивали для конструкций AK081, AK111, AK167 и AK168 наряду с контролем, представляющим собой антитело к

RSV, где результаты показаны на ФИГ. 27А и 27В для печени и легкого соответственно. Для каждого изображено среднее число мононуклеарных клеток в печени (ФИГ. 27А) и среднее число мононуклеарных клеток в легком (ФИГ. 27В). Как показано на ФИГ. 27В, например, конструкции маскированного полипептида IL-2 AK111 и AK168 не приводили к получению поддающегося выявлению количества мононуклеарных клеток в легком в отличие от немаскированных конструкций AK081 и AK167.

Фенотип инфильтрирующих иммунных клеток

Оценивают фенотип иммунных клеток, инфильтрирующих опухоли in vivo, в моделях на мышах, обработанных конструкциями маскированного полипептида IL-2, полученными в примере 1. Мышей обрабатывают конструкциями и оценивают фенотип иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль. В некоторых экспериментах некоторых мышей обрабатывают контролями для сравнения. В некоторых экспериментах некоторых мышей обрабатывают алдеслейкином в качестве контроля для обработки маскированным полипептидом IL-2. Мышей, несущих опухоли, обрабатывают конструкцией, алдеслейкином или другим контролем, и опухоли, ткани, такие как печень, легкое и селезенка, и кровь собирают в различные моменты времени после введения начальной дозы, например, через пять дней, семь дней или десять дней после введения начальной дозы. В некоторых экспериментах иммунные клетки выделяют из опухолей, тканей и крови и подвергают оценке фенотипа с применением проточной цитометрии. В некоторых экспериментах выделенные иммунные клетки оценивают с применением маркеров, представляющих интерес, например таковых для CD8+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток памяти, активированных NK-клеток, CD4+ Т-клеток и CD4+ клеток Treg.

В некоторых исследованиях фенотип иммунных клеток, инфильтрирующих опухоли in vivo, оценивали с применением следующего способа. Самок мышей C57BL/6 приобретали в Charles River Laboratories, и их возраст составлял 8-10 недель на момент начала исследования. Опухолевые клетки MC38 (5 x10^5 клеток на мышь) вводили посредством подкожной инъекции в правый бок каждой мыши. При достижении размера опухоли, составляющего ~100 мм^3 (день 0), мыши получали однократную внутривенную дозу конструкции, представляющей интерес, составляющую 2 мг/кг (например, конструкции немаскированного исходного полипептида IL-2, конструкции маскированного полипептида IL-2 или конструкции нерасщепляемого маскированного полипептида IL-2) в PBS. В день 5 мышей подвергали эвтаназии посредством асфиксии с помощью CO2 и собирали опухоли, печень, селезенку и кровь. Суспензии клеток получали из селезенки посредством механического разрушения и пропускания через клеточное сито с размером ячеек 40 мкм. Ткани опухоли подвергали ферментативному расщеплению с применением реагентов Miltenyi Tumor Dissociation Kit (Miltenyi, № по кат. 130-096-730), и gentleMACS Dissociator (Miltenyi) применяли для стадий механического разрушения. Эритроциты в суспензиях клеток селезенки и опухоли и в крови подвергали лизису с применением буфера ACK (Gibco, № по кат. A10492). Суспензии клеток окрашивали с помощью следующих антител: CD45 (клон 30-F11, eBioscience), CD3 (клон 2C11, Biolegend), CD8 (клон 53-6.7,

BD Biosciences), CD4 (клон RM-45, BD Biosciences), FOXP3 (MF-14, Biolegend), CD25 (3C7, Biolegend), CD44 (клон IM7, eBioscience) и NKp46 (29A1.4, eBioscience). Сбор данных выполняли с помощью проточного цитометра MACSQuant Analyzer (Milenyi) и анализировали данные с применением FlowJo.

Результаты исследований, в ходе которых тестировали ответы in vivo в виде процентных долей CD4, CD8, NK и Treg в селезенке, крови и опухоли, выполненных как описано выше, при использовании конструкций AK032, AK081, AK111, AK167 и AK168, а также контроля, представляющего собой IgG к RSV, показаны на ФИГ. 20A-20L. AK111 и AK168 представляют собой иллюстративные конструкции маскированного полипептида IL-2.

Результаты исследований, в ходе которых тестировали ответы in vivo в виде процентных долей CD4, CD8, NK и Treg в селезенке, крови и опухоли, выполненных как описано выше, при использовании конструкций AK167, AK168, AK191, AK197, AK203, AK209 и AK211, а также контроля, представляющего собой IgG к RSV, показаны на ФИГ. 21A-21L. AK168, AK191, AK197, AK203 и AK209 представляют собой иллюстративные конструкции маскированного полипептида IL-2, каждая из которых содержит отличающуюся последовательность расщепляемого пептида в линкере, соединяющем полипептид IL-2 с доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни. Статистический анализ выполняли с применением однофакторного ANOVA при сравнении с нерасщепляемой конструкцией AK211.

Результаты исследований, в ходе которых тестировали ответы in vivo в виде процентных долей CD4, CD8, NK и Treg в селезенке, крови и опухоли, выполненных как описано выше, при использовании конструкций AK235, AK191, AK192, AK193, AK210, AK189, AK190 и AK211, показаны на ФИГ. 22A-22L. AK191, AK192, AK193, AK210, AK189 и AK190 представляют собой иллюстративные конструкции маскированного полипептида IL-2, каждая из которых содержит последовательность расщепляемого пептида в линкере, соединяющем полипептид IL-2 с доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни. Линкерная последовательность в данных конструкциях также отличается в зависимости от используемой линкерной последовательности. AK189, AK190, и AK210 содержат полипептид IL-2, предусматривающий мутацию C125A, и AK191, AK192 и AK193 содержат полипептид IL-2, предусматривающий мутации C125A, R38A, F42A, Y45A и E62A. Конструкция AK235 представляет собой немаскированную конструкцию, и конструкция AK211 содержит нерасщепляемую линкерную последовательность. Статистический анализ выполняли с применением однофакторного ANOVA при сравнении с нерасщепляемой конструкцией AK211.

Результаты исследований, в ходе которых тестировали активацию Т-клеток in vivo в селезенке, крови и опухоли, выполненных как описано выше, при использовании конструкций AK235, AK191, AK192, AK193, AK210, AK189, AK190 и AK211, как описано выше, показаны на ФИГ. 23A-23I. Активацию Т-клеток измеряли в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI) CD25 в CD8+ Т-клетках, CD4+ Т-клетках или Foxp3+

клетках в селезенке, крови и опухоли. Статистический анализ выполняли с применением однофакторного ANOVA при сравнении с нерасщепляемой конструкцией AK211.

Расщепление in vivo

Оценивают расщепление конструкций маскированного цитокина IL-2 (например, конструкций маскированного полипептида IL-2) in vivo. В некоторых исследованиях контрольное антитело вводят для сравнения. В некоторых исследованиях расщепление in vivo оценивают посредством введения конструкции, представляющей интерес, в организм мыши, и захвата IgG человека через определенный промежуток времени, и последующего измерения уровней, например, IgG человека, CD122 и IL-2.

В некоторых исследованиях, в ходе которых тестировали расщепление конструкций маскированного полипептида IL-2 in vivo, уровни лекарственного средства (т. е. уровни введенной конструкции, включая побочные продукты расщепления) определяли с применением ELISA с использованием антитела к IgG человека (клон M1310G05, Biolegend) в качестве антитела захвата и различных антител для выявления. Конъюгированные с HRP или биотином антитела к IgG человека (ab97225, Abcam) или CD122 (клон 9A2, Ancell) и IL-2 (Poly5176, Biolegend) для выявления использовали для выявления уровней общего и нерасщепленного лекарственного средства соответственно. Концентрации расщепленного и высвобождаемого IL-2 рассчитывают посредством вычитания концентрации нерасщепленного (т. е. интактного) лекарственного средства из общей концентрации лекарственного средства. На ФИГ. 24A-24D изображены результаты исследований, в ходе которых тестировали расщепление in vivo иллюстративных конструкций маскированного полипептида IL-2 AK168 (последовательность расщепляемого пептида: MPYDLYHP) и AK209 (последовательность расщепляемого пептида: VPLSLY; SEQ ID NO: 15). Конструкция AK167 представляет собой конструкцию расщепляемого немаскированного полипептида IL-2, которая содержит тот же полипептид IL-2, что и конструкция маскированного AK168. Как показано на ФИГ. 24A-24D, как маскированные (AK168 и AK209), так и немаскированные (AK167) конструкции эффективно расщеплялись, и обе последовательности расщепляемого пептида расщеплялись. На ФИГ. 24E изображены результаты фармакокинетического исследования общей концентрации IgG в плазме крови (мкг/мл) для общих уровней конструкций AK167, AK168 и AK209 и для уровней нерасщепленных форм каждой конструкции.

Эрадикация опухоли и подавление метастазирования

Способность конструкций маскированного полипептида IL-2, полученных в примере 1, способствовать эрадикации опухоли и подавлять метастазирование оценивают in vivo с применением моделей на мышах, таких как модели с сингенными опухолями MC38, CT26 и B16F10.

Мышам подкожно имплантируют опухолевые клетки и обеспечивают рост опухолей до пальпируемого размера. Мышей, несущих опухоль, обрабатывают конструкциями маскированного IL-2 и объем опухоли измеряют на протяжении курса обработки. В некоторых экспериментах некоторых мышей обрабатывают контролями для

сравнения. В некоторых экспериментах некоторых мышей обрабатывают алдеслейкином в качестве контроля для обработки маскированным полипептидом IL-2. Объем опухоли периодически измеряют на протяжении курса обработки. В некоторых экспериментах вес тела также периодически измеряют на протяжении курса обработки. В некоторых экспериментах образцы плазмы крови получают на протяжении курса обработки и анализируют в отношении фармакокинетики, фармакодинамики, расщепления и маркеров в крови, таких как маркеры для CD8+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток памяти, активированных NK-клеток, CD4+ Т-клеток и CD4+ клеток Treg.

Способность конструкций маскированного полипептида IL-2 подавлять метастазирование также оценивают in vivo с применением моделей на мышах, подходящих для исследований метастазирования, таких как модели с сингенными опухолями CT26 для оценки метастазирования в легкие. Мышам подкожно имплантируют опухолевые клетки. В некоторых экспериментах обеспечивают рост опухолей до пальпируемого размера до обработки. В некоторых экспериментах обработку начинают до того, как опухоли вырастут до пальпируемого размера. Мышей, несущих опухоль, обработанных конструкциями маскированного IL-2, оценивают в отношении метастазирования опухолевых клеток в ткани, такие как легкие, печень и лимфоузлы.

В некоторых исследованиях модель с сингенной опухолью применяли для оценки способности конструкции маскированного полипептида IL-2 обеспечивать уменьшение объема опухоли в соответствии со следующим способом. Самок мышей C57BL/6 приобретали в Charles River Laboratories, и их возраст составлял 8-10 недель на момент начала исследования. Опухолевые клетки MC38 (5 x105 клеток на мышь) вводили посредством подкожной инъекции в правый бок каждой мыши. При достижении размера опухоли, составляющего ~125 мм3 (день 0), мышей рандомизировали для получения доз AK081, AK111, AK167 или AK168, составляющих 2 мг/кг, или антитела к RSV в качестве контроля в PBS. Мышам вводили дозы внутрибрюшинно три раза в неделю в количестве 6 доз. Рассчитывали объем опухоли (длина*(ширина^2)/2) с применением штангенциркуля и регистрировали показатели веса тела два раза в неделю. На ФИГ. 28A и 28B показаны результаты исследования с использованием модели с сингенной опухолью, в ходе которого оценивали объем опухоли и вес тела на протяжении курса обработки. Как показано на ФИГ. 28A, обработка с применением иллюстративных конструкций полипептида IL-2, включая маскированные конструкции AK111 и AK168, приводила к подавлению роста опухоли с течением времени по сравнению с контролем, представляющим собой антитело к RSV. Как показано на ФИГ. 28B, наблюдалось общее отсутствие снижения веса тела, если мышей обрабатывали маскированными конструкциями AK111 и AK168.

Биологическая активность у макаков-крабоедов

Биологическую активность in vivo конструкций маскированного полипептида IL-2, полученных в примере 1, оценивают in vivo у макаков-крабоедов. Макаков-крабоедов обрабатывают конструкциями и оценивают биологическую активность, фармакокинетику и расщепление in vivo. В некоторых экспериментах некоторых обезьян обрабатывают

контролями для сравнения. В некоторых экспериментах некоторых обезьян обрабатывают алдеслейкином в качестве контроля для обработки маскированным полипептидом IL-2. В некоторых экспериментах обезьян обрабатывают различными дозами конструкции, алдеслейкина или другого контроля. Кровь собирают у обезьян в различные моменты времени и затем оценивают в отношении определенных типов клеток, таких как CD8+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки памяти, активированные NK-клетки, CD4+ Т-клетки и клетки CD4+ Treg, и/или маркеров, представляющих интерес, таких как маркеры дозозависимого ответа общих лимфоцитов, Ki67+, и растворимый CD25. В некоторых экспериментах оценивают долгосрочную кинетику пролиферации и размножения определенных типов циркулирующих Т- и NK-клеток. В некоторых экспериментах фармакокинетику и расщепление конструкций маскированного полипептида IL-2 определяют посредством ELISA, PAGE и масс-спектрометрии.

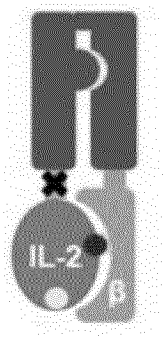
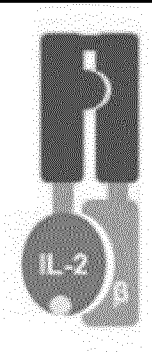
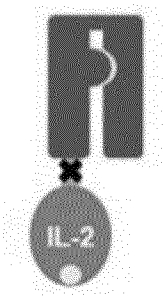
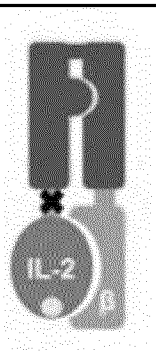
Для тестирования профиля безопасности иллюстративных конструкций маскированного полипептида IL-2 у приматов, отличных от человека, проводят исследование с подбором дозы в соответствии со следующим способом. Группы из 3 здоровых самцов макаков-крабоедов (Macaca fascicularis) произвольно распределяют для получения однократной внутривенной болюсной дозы, составляющей 2 мл/кг, активируемых (т. е. расщепляемых) белков, представляющих собой маскированные полипептиды IL-2, или белков, представляющих собой нерасщепляемые маскированные полипептиды IL-2, при 10, 30 и 100 нмоль/кг в 100 мМ натрий-цитратном буфере (pH 5,5). Третья группа получает исходный немаскированный расщепляемый белок при 3, 10 и 30 нмоль/кг в качестве положительного контроля. Данной третьей группе вводят дозы в более низком диапазоне с учетом более высокой активности исходных немаскированных молекул. Дозы рассчитывают в молях, чтобы учесть различия в молекулярной массе. Образцы крови собирают перед введением дозы и через 1, 24, 48, 72, 96, 168, 264 и 336 часов после введения дозы. Автоматический гематологический анализатор применяют для мониторинга изменений в подгруппах лимфоцитов и химических показателей сыворотки крови. Уровни общего и интактного (т. е. нерасщепленного) лекарственного средства измеряют в плазме крови с применением специализированного ELISA, как описано выше. Уровни растворимого CD25 измеряют с помощью ELISA (R&D systems, № по кат. DR2A00) для мониторинга иммунной стимуляции. Уровни воспалительных цитокинов в плазме крови количественно определяют с применением специализированного мультиплексного электрохемилюминесцентного анализа (Meso Scale Discovery). Мониторинг кровяного давления осуществляют в качестве индикатора синдрома транссудации. PK анализируют с применением ELISA, в ходе которого захватывается IL-2 и выявляется Fc человека, и посредством ELISA, в ходе которого захватывается Fc человека и выявляется Fc человека.

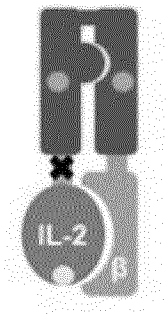
Пример 4.

Самок мышей C57BL/6 приобретали в Charles River Laboratories, и их возраст составлял 8-10 недель на момент начала исследования. Опухолевые клетки MC38 (5 x10^5 клеток на мышь) вводили посредством подкожной инъекции в правый бок каждой мыши.

При достижении размера опухоли, составляющего ~100 мм^3 (день 0), мыши внутрибрюшинно получали однократную высокую дозу различных конструкций Fc-IL-2 в PBS. Плазму крови собирали через 5 мин в дни 3, 5 и 7 после введения дозы.

Применяемые конструкции представляют собой следующие.

AK443 (VPLSLY) Выключенный IL-2	
AK211	
AK235 (VPLSLY)	
AK209 (VPLSLY)	

AK471 (VPLSLY) Мутантный FcRn	

Иммунофенотипирование выполняли с применением способа на основе FACS. В день 5 мышей подвергали эвтаназии посредством асфиксии с помощью CO2 и собирали опухоли, печень, селезенку и кровь. Суспензии клеток получали из селезенки посредством механического разрушения и пропускания через клеточное сито с размером ячеек 40 мкм. Ткани опухоли подвергали ферментативному расщеплению с применением реагентов Miltenyi Tumor Dissociation Kit (Miltenyi, № по кат. 130-096-730), и gentleMACS Dissociator (Miltenyi) применяли для стадий механического разрушения. Эритроциты в суспензиях клеток селезенки и опухоли и в крови подвергали лизису с применением буфера ACK (Gibco, № по кат. A10492).

Суспензии клеток окрашивали с помощью следующих антител: CD45 (клон 30-F11, eBioscience), CD3 (клон 2C11, Biolegend), CD8 (клон 53-6.7, BD Biosciences), CD4 (клон RM-45, BD Biosciences). Сбор данных выполняли с помощью проточного цитометра MACSQuant Analyzer (Milenyi) и анализировали данные с применением FlowJo.

Уровни лекарственного средства определяли с применением ELISA с использованием антитела к IgG человека (клон M1310G05, Biolegend) в качестве антитела захвата и различных вторичных антител. Конъюгированные с HRP или биотином антитела к IgG человека (ab97225, Abcam) или CD122 (клон 9A2, Ancell) и IL-2 (Poly5176, Biolegend) для выявления использовали для выявления уровней общего и нерасщепленного лекарственного средства соответственно.

AK471 с мутацией I253A в FcRn индуцировала устойчивое размножение CD8 T-клеток в микроокружении опухоли, оставаясь при этом неактивной по периферии, как показано на фигурах 29A и 29B.

AK471 характеризуется незначительно более коротким периодом полужизни по сравнению с аглико-hIgG1, как показано на фигурах 30 A, B и C.

Отсутствует подтверждение расщепления или декапитации для AK471 в плазме крови (фигуры 31 A, B и C).

<u>Пример 5 Гетероокклюзия IL-12</u>

Расщепление и связывание с рекомбинантными рецепторами IL-12, IL-12Rb1 и IL-12Rb2 посредством SPR

Сенсорные чипы покрывали рецепторами IL-12 и осуществляли их иммобилизацию. Обеспечивали протекание разбавлений конструкций IL-12 по чипам с иммобилизованными рецепторами IL-12 для определения скорости ассоциации при 25 градусах C. При

достижении равновесия (примерно 3-4 минуты) проточный буфер заменяли на PBST для определения значений скорости диссоциации в течение 6 минут. После каждого анализа чип восстанавливали. В таблицах представлены данные, полученные посредством SPR (фигуры 34 и 35). ND означает «не определено», поскольку маскирование IL-12 предотвращало связывание с рецепторами; поэтому количественные показатели связывания было невозможно определить.

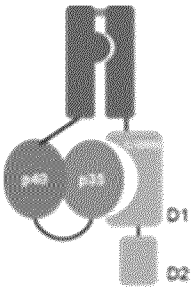
Тестирование молекул IL-12 с помощью клеток HEK-Blue IL-12

Клетки HEK-Blue IL-12 с репортерным геном, разработанные компанией Invivogen, были специально сконструированы для мониторинга активации пути JAK-STAT. Эти клетки получали посредством стабильной трансфекции клеток HEK293 генами IL-12Rβ1 и IL-12Rβ2 человека наряду с генами JAK2 и STAT4 человека с получением полностью функционального сигнального пути IL-12. Кроме того, также был введен STAT4-индуцируемый репортерный ген SEAP. После стимуляции клетки HEK-Blue™ IL-12 запускают активацию STAT4 и последующую секрецию SEAP. Мониторинг уровней STAT4-индуцируемой SEAP можно легко осуществлять с применением QUANTI-Blue™. Клетки HEK-Blue IL-12 можно применять для подтверждения функциональности, токсичности и вариабельных эффектов дозировки IL-12 человека или мыши. Клетки HEK Blue IL-12 выращивали в средах для пересева до ~80% конфлюэнтности. Промытую суспензию отдельных клеток в средах для анализа высевали, и серийные разбавления молекул IL-12 в средах для анализа добавляли к клеткам. Планшет инкубировали при 37oC в течение 24 часов. Через 24 ч получали раствор Quanti-Blue (Invivogen) и надосадочную жидкость клеток добавляли к раствору Quanti-Blue и инкубировали в течение 1-2 ч при 37oC. Измеряли поглощение при 625 нм. Анализ данных выполняли в Graphpad Prism версии 8.3. Исходные данные вычитали из необработанных данных и данные подвергали нелинейному аппроксимированию: [агонист] по сравнению с ответом - переменный угловой коэффициент (четыре параметра). Регистрировали значение EC50 для каждой конструкции IL-12.

Пример 6

В данном примере исследуется, изменяет ли PK мутация в GAG-связывающем домене в конструкциях IL-12, два мутантных GAG-связывающих варианта (AK600 и AK601) сравнивали с конструкцией IL-12 WT (AK598) у мышей C57BL/6, не несущих опухоль. AK600 содержит KDNTERV, и AK601 содержит KDNTEGRV в мутантных GAG-связывающих доменах соответственно.

Все из AK598, AK600 и AK601 характеризуются следующей структурой конструкции:



Животным вводили однократную дозу, составляющую либо 1 мг/кг, либо 10 мг/кг, посредством i.v. инъекции. Уровни лекарственного средства в плазме крови измеряли с применением захвата Fc человека (IgG от Southern Biotech, № по кат. 2049-01, антитело козы к IgG человека, ads-UNLB обезьяны), выявления Fc человека (ab97225) и/или захвата Fc человека/антитела к IL-12 человека (ab83448) с выявлением посредством ELISA.

	Тестируемая молекула	Мутантный GAG	M.W. (kDa)	Примерн. дозировка (мг/кг)	Фактическая дозировка (нмоль/кг)	Фактическая дозировка (мг/кг)	Информация о партии
1	**AK600**	KDNTERV	143,8	10	69,5	10	02A
2	**AK600**	KDNTERV	143,8	1	6,95	1	02A
3	**AK601**	KDNTEGRV	143,9	10	69,5	10	01A
4	**AK601**	KDNTEGRV	143,9	1	6,95	1	01A
5	**AK598**	WT	144,3	10	69,5	10	02A
6	**AK598**	WT	144,3	1	6,95	1	02A

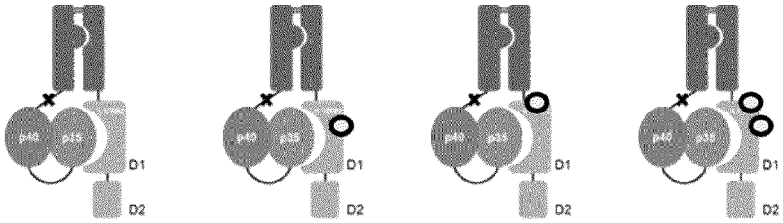
Посредством ELISA было обнаружено, что мутация в GAG-связывающем домене как из AK600, так и из AK601 улучшает воздействие лекарственного средства по Cmax и AUC по сравнению с AK598. Никакой разницы в PK-профилях между AK600 и AK601 не наблюдалось. Как AK600, так и AK601 характеризуются периодом полужизни, сходным с периодом полужизни AK598, который составляет приблизительно 2 дня.

Результаты показаны на фигурах 36-40.

Пример 7

Свободные остатки цистеина способны вызывать межмолекулярное сшивание и агрегацию. В данном примере тестируется, оказывают ли эффект аминокислотные мутации с заменой цистеина на серин в отношении агрегации и стабильности.

В данном примере применяли следующие конструкции:



Молекула	AK386	AK604	AK605	AK606
Цитокин	IL-12	IL-12	IL-12	IL-12
Остов	Зажим	Зажим	Зажим	Зажим
Мутация	**WT**	**C242S**	**C252S**	**C242S/ C252S**

Последовательности AK386, AK604, AK605 и AK606 представлены в таблице последовательностей в разделе 10.

Белки инкубировали с указанным буфером при 40C в течение 3 дней или 12 дней. Затем молекулы анализировали посредством эксклюзионной HPLC-хроматографии и посредством SDS-PAGE и окрашивания с помощью Кумасси.

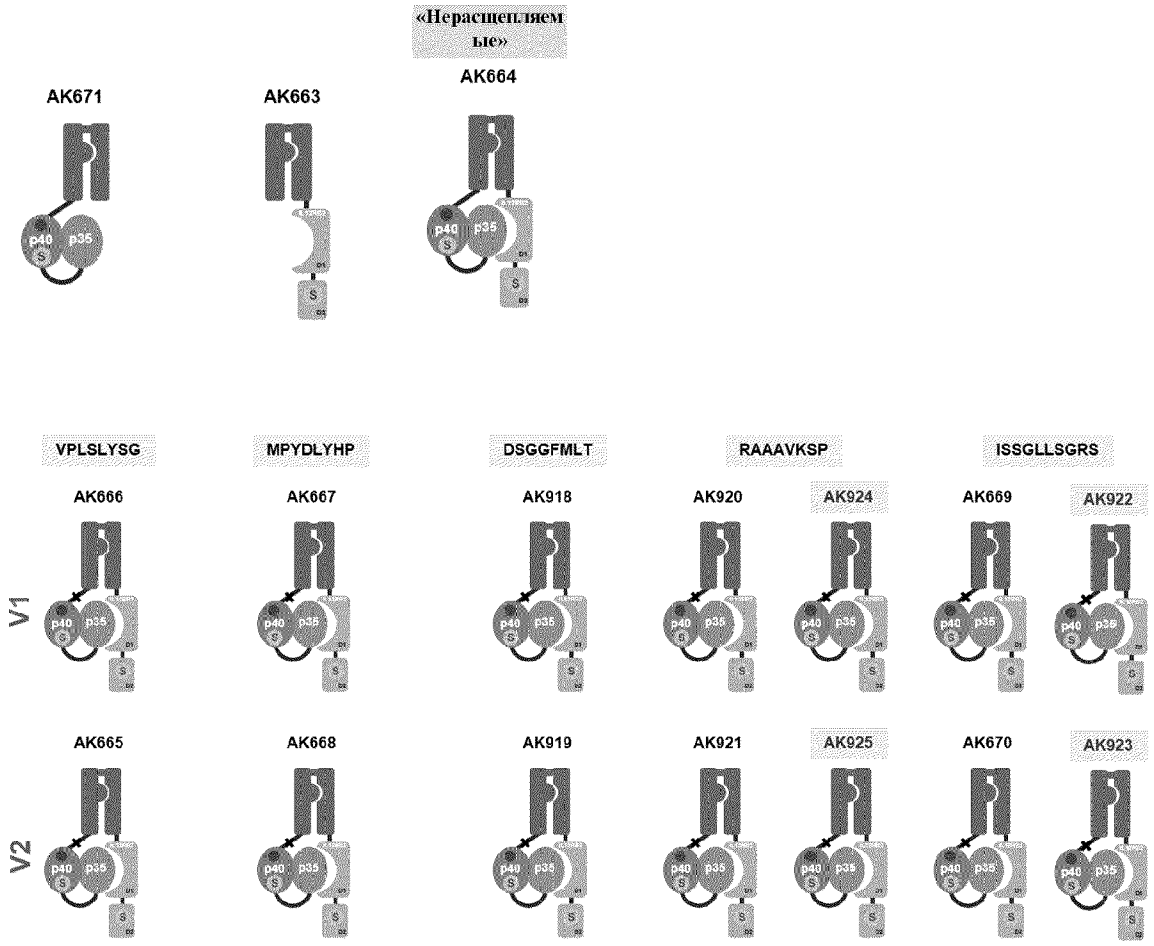
В день 3 присутствовала агрегация, достаточная только для того, чтобы оценить стабильность в условиях с 2 буферами, где AK606 была оценена как лучшая. Тенденция к большей стабильности с мутациями Cys Ser. В день 12 AK606 оценили как лучшую в условиях с 6 дополнительными буферами. Мутации Cys Ser, по-видимому, придают стабильность. SDS-PAGE демонстрирует, что Cys242 вызывает более сильную ковалентную агрегацию, чем Cys252. Показан день 0/12, AK386 и AK605 демонстрируют гораздо более сильную ковалентную агрегацию, чем AK604 и AK606.

Результаты показаны на фигурах 41-43.

Пример 8

В данном примере демонстрируется маскирование и расщепление иллюстративных конструкций IL-12.

В данном примере применяли следующие конструкции:



AK671 представляет собой немаскированную молекулу, AK663 не содержит цитокин, и AK664 является нерасщепляемой. Эти три молекулы служат в качестве контролей.

Расщепляемый пептид для каждой конструкции показан вверху каждого столбца.

AK666, AK667, AK918, AK920 и AK669 являются конструкциями «версии 1». AK665, AK668, AK919, AK921, AK670 являются конструкциями «версии 2». AK924, AK922, AK925 и AK923 являются конструкциями «версии 3».

Расщепляемый линкер (линкер с сайтом протеазы), т. е. между доменами HL2 и IL-12, и нерасщепляемый линкер (линкер рецептора b2) между HL1 и маскирующим компонентом для каждой версии показаны ниже.

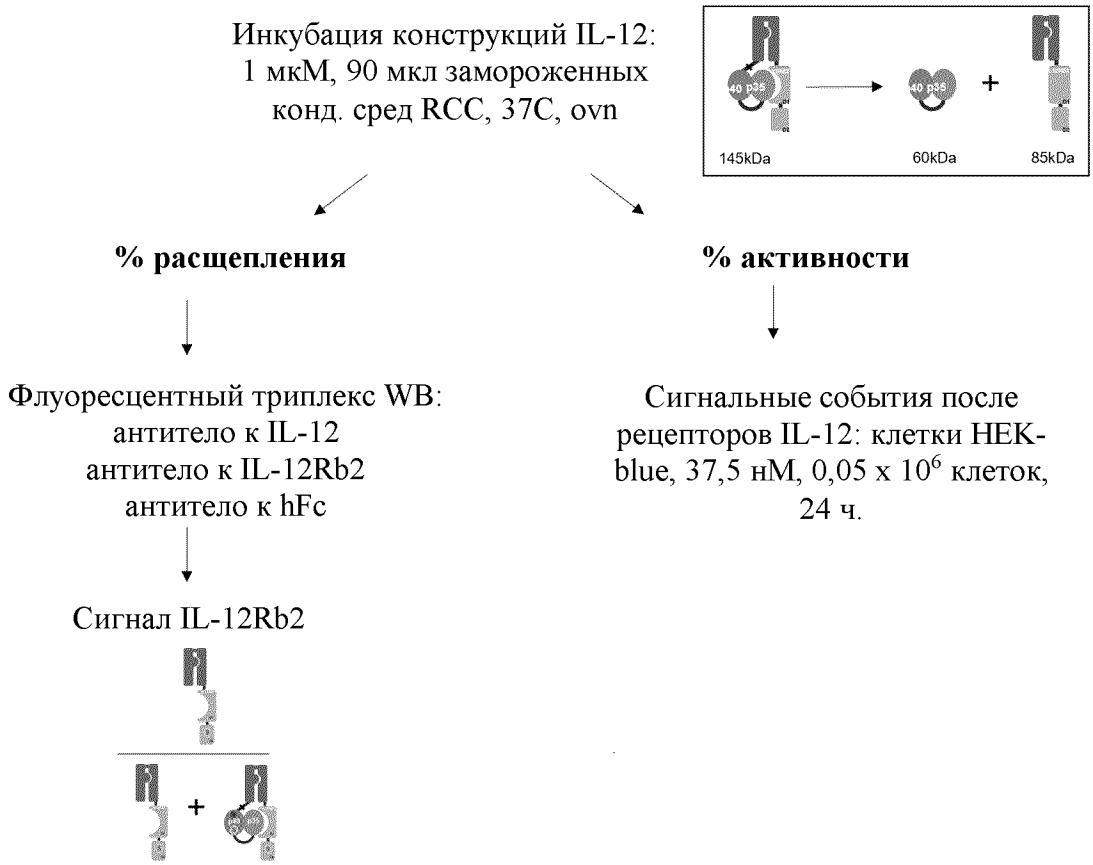
V1	Линкер сайта протеазы
V1	GGSGGSXXXXXXSGP
V2	GGSGGSGGSXXXXXXSGP

	Линкер рецептора B2
V1	PGGSGP
V2	GGSPG
V3	GGSGGGSG

Там, где это применимо, все эти конструкции содержат мутацию KDNTEGRV в GAG-связывающем домене субъединицы IL-12p40, мутацию C252S в субъединице IL-12p40 и мутацию C242S в домене IL-12RB2. Точные последовательности каждой конструкции показаны в таблицах последовательностей в разделе 10.

Анализ расщепления ex vivo (передача сигнала WB/IL-12)

Инкубировали 1 мкМ конструкции IL-12 с 90 мкл кондиционированных сред в течение ночи или с 90 мкл плазмы крови в следующие моменты времени (d1-d2-d4-d7-d9-d11) при 37C. Скорость расщепления рассчитывают как соотношение расщепленная конструкция/(расщепленная конструкция+интактная конструкция) с применением вестерн-блоттинга с антителом к IL-12 человека и антителом к IL-12Rb человека. Активацию этих конструкций кондиционированными средами для культивирования тканей человека оценивают с применением анализа передачи сигнала от рецептора IL-12, где 0,05×106 клеток HEK-Blue инкубируют с 37,5 нМ конструкций в течение 24 ч.



Результаты показаны на фигуре 44 и в таблицах ниже.

Молекулы со следующими сайтами расщепления демонстрировали легко выявляемое расщепление в образцах надосадочной жидкости из опухоли:

RAAAVKSP

ISSGLLSGRS

MPYDLYHP

Чувствительность сайтов расщепления наблюдали в следующем порядке:

RAAAVKSP>ISSGLLSGRS>MPYDLYHP

Таким образом, конструкции IL-12, которые несут эти сайты расщепления, являются хорошими кандидатами для селективной активации в опухоли при RCC и других

Пороговое значение 1%, n = 30

	% расщепления (WB)				% активности (анализ передачи сигнала)			
	ISSGLLSGRS				ISSGLLSGRS			
	AK669	AK670	AK922	AK923	AK669	AK670	AK922	AK923
Количество образцов с расщеплением > 1%, активность	2	5	2	2	3	9	1	8
Частота расщепления, активация (%)	6,7	**16,7**	6,7	6,7	10,0	30,0	3,3	26,7
% активации (медианное значение)	5,5	1,8	5,8	**8,2**	1,7	2,2	5,8	1,2

	RAAAVKSP				RAAAVKSP			
	AK920	AK921	AK924	AK925	AK920	AK921	AK924	AK925
Количество образцов с расщеплением > 1%, активность	7	4	3	3	7	5	6	7
Частота расщепления, активация (%)	23,3	13,3	10,0	10,0	23,3	16,7	20,00	23,3
% активации (медианное значение)	1,8	2,0	13,6	2,6	1,9	**2,5**	1,8	1,7

	MPYDLYHP		MPYDLYHP	
	AK667	AK668	AK667	AK668
Количество образцов с расщеплением > 1%, активность	2	2	5	8
Частота расщепления, активация (%)	6,7	6,7	16,7	**26,7**
% активации (медианное значение)	2,3	2,7	1,5	1,7

	VPLSLYSG		VPLSLYSG	
	AK665	AK666	AK665	AK666
Количество образцов с расщеплением > 1%, активность	7	1	7	4
Частота расщепления, активация (%)	23	3	23	13
% активации (медианное значение)	2,5	1	2,1	1,6

	DSGGFMLT		DSGGFMLT	
	AK918	AK919	AK918	AK919
Количество образцов с расщеплением > 1%, активность	5	4	3	5
Частота расщепления, активация (%)	17	13	10	17
% активации (медианное значение)	1,8	2,1	1,7	1,3

<u>Анализ расщепления in vitro: анализ с применением HEK Blue IL-12 и SDS-PAGE</u>

Тестирование молекул IL-12 с помощью клеток HEK-Blue IL-12

Клетки HEK-Blue IL-12 с репортерным геном, разработанные компанией Invivogen, были специально сконструированы для мониторинга активации пути JAK-STAT. Эти клетки получали посредством стабильной трансфекции клеток HEK293 генами IL-12Rβ1 и IL-12Rβ2 человека наряду с генами TyK2, JAK2 и STAT4 человека с получением полностью функционального сигнального пути IL-12. Кроме того, также был введен STAT4-индуцируемый репортерный ген SEAP. После стимуляции клетки HEK-Blue™ IL-12

запускают активацию STAT4 и последующую секрецию SEAP. Мониторинг уровней STAT4-индуцируемой SEAP можно легко осуществлять с применением QUANTI-Blue™. Клетки HEK-Blue IL-12 можно применять для подтверждения функциональности, токсичности и вариабельных эффектов дозировки IL-12 человека или мыши. Клетки HEK Blue IL-12 выращивали в средах для пересева до ~80% конфлюэнтности. Промытую суспензию отдельных клеток в средах для анализа высевали, и серийные разбавления молекул IL-12 в средах для анализа добавляли к клеткам. Планшет инкубировали при 37оС в течение 24 ч. Через 24 ч получали раствор Quanti-Blue (Invivogen) и надосадочную жидкость клеток добавляли к раствору Quanti-Blue и инкубировали в течение 1-2 ч при 37оС. Измеряли поглощение при 625 нм. Анализ данных выполняли в Graphpad Prism версии 8.3. Исходные данные вычитали из необработанных данных и данные подвергали нелинейному аппроксимированию: [агонист] по сравнению с ответом - переменный угловой коэффициент (четыре параметра). Регистрировали значение EC50 для каждой конструкции IL-12.

Маскирование

Результаты показаны в таблицах ниже и на фигурах 45, 46A и B.

Конструкция	Анализ 1, EC_{50}	Окклюзия	Анализ 2, EC_{50}	Окклюзия	Средняя окклюзия
AK671	24,7	N/A	15,2	N/A	N/A
rhIL-12	9,6	N/A	8,2	N/A	N/A
AK386-нуль	447,9	19,4	367,5	14,9	17,1
AK664-нуль	1854,0	75,2	1677,0	68,0	71,6
AK665-нуль	1303,0	52,9	1491,0	60,5	56,7
AK666-01A-нуль	1775,0	72,0	2009,0	81,5	76,8
AK666-02A-нуль	1725,0	70,0	1537,0	62,4	66,2
AK667-нуль	3104,0	125,9	2035,0	82,6	104,2
AK668-нуль	1383,0	56,1	1370,0	55,6	55,8
AK669-нуль	895,6	36,3	1193,0	48,4	42,4
AK670-нуль	740,9	30,1	862,1	35,0	32,5
AK922-нуль	1183,0	48,0	1101,0	44,7	46,3
AK923-нуль	1562,0	63,4	1188,0	48,2	55,8
AK918-нуль	2886,0	117,1	3116,0	126,4	121,7
AK919-нуль	1230,0	49,9	1475,0	59,8	54,9
AK920-нуль	1116,0	45,3	1116,0	45,3	45,3
AK921-нуль	1698,0	68,9	1352,0	54,8	61,9
AK924-нуль	1030,0	41,8	766,4	31,1	36,4
AK925-нуль	995,1	40,4	914,8	37,1	38,7

Исходная AK671 является менее эффективной, чем rhIL-12 (но незначительно, т. е. в 3 раза). Все маскированные конструкции более подвержены окклюзии, чем AK386. AK667 и AK918 подвергаются > 100-кратной окклюзии.

По сравнению с AK386 все новые молекулы, которые содержат мутацию в GAG-связывающем домене, мутации с заменой остатков цистеина на остатки серина, новые оптимизированные линкеры, а также различные сайты расщепления, демонстрируют улучшенное маскирование.

Расщепление

Расщепление конструкций тестировали с применением иллюстративных протеаз

MMP7, 9 и 10.

Партия 1

ID AK	№ серии белка	300 ng MMP	Всего расщепленной конструкции, мкг
AK663	AK663-01A	7	8,8
AK664	AK664-01A	7	14,8
AK665	AK665-01A	7	14,8
AK666	AK666-01A	7	14,8
AK667	AK667-01A	10	14,9
AK668	AK668-01A	10	14,9
AK669	AK669-01A	2	14,9
AK670	AK670-01A	2	14,9
AK671	AK671-01A	7	11,3
AK386	AK386-03A	7	14,9
AK674	AK674-01A	7	15,1

Результаты показаны на фигурах 47A-B и 48A-K

Партия 2

ID AK	№ серии белка	300 ng MMP	Всего расщепленной конструкции, мкг
AK667	AK667-01A	7,9,10	14,86
AK671	AK671-01A	7,9,10	11,31
AK918	AK918-01A	7	14,84
AK919	AK919-01A	7	14,85
AK920	AK920-01A	9	14,83
AK921	AK921-01A	9	14,84
AK386	AK386-03A	7	14,90

Результаты показаны на фигурах 49A-B и 50A-G

Партия 3

ID AK	№ серии белка	300 ng MMP	Всего расщепленной конструкции, мкг
AK386	AK386-04A	7, 10	14,9
AK922	AK922-01A	7	14,9
AK923	AK923-01A	7	14,9
AK924	AK924-01A	10	14,8
AK925	AK925-01A	10	14,9
AK671	AK671-02A	N/A	N/A

Результаты показаны на фигурах 51 и 52A-E

В целом, все новые молекулы с различными сайтами расщепления восприимчивы к расщеплению с помощью MMP in vitro. В случае всех молекул происходит восстановление активности после расщепления. Эти соединения являются хорошими кандидатами для опухолеселективных активируемых молекул IL-12.

Пример 9

Расщепление пептидов надосадочной жидкостью культуры NAT по сравнению с RCC

Последовательности, содержащие расщепляемые пептиды (показанные жирным шрифтом ниже), инкубировали либо в надосадочной жидкости культуры «NAT» (нормальной соединительной ткани), либо в надосадочной жидкости культуры «RCC» (почечноклеточной карциномы) для тестирования специфичности расщепления каждого пептида.

В этой связи секвенирование пептидов посредством масс-спектрометрии применяли для идентификации расщепленных фрагментов, полученных для синтетических пептидов, показанных в таблице ниже, с применением опубликованной методики, называемой мультиплексным профилированием субстрата посредством масс-спектрометрии (O'Donoghue A.J. et al. Nat Methods. 2012 Nov;9(11):1095-100.) Мониторинг расщепления в данных реакциях осуществляли с течением времени, и пептиды, расщепление которых наблюдалось в наиболее ранние моменты времени, считали наиболее чувствительными к протеолитической активности в образцах кондиционированных сред.

Результаты были следующими.

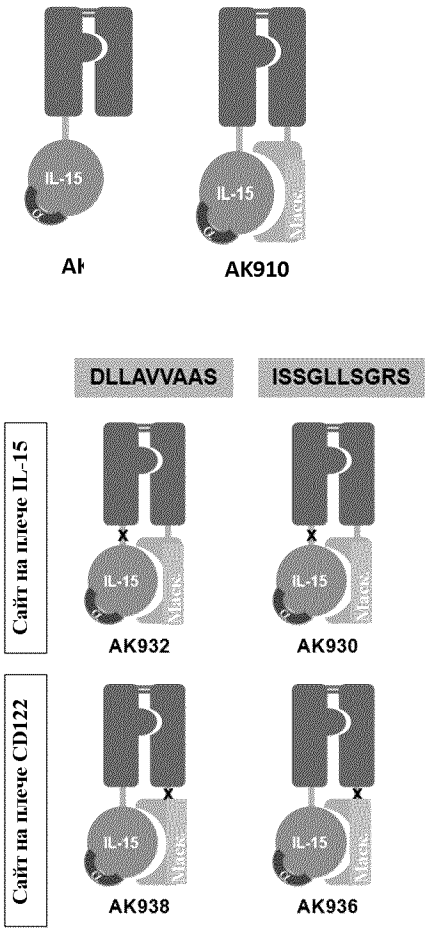
Субстрат	Последовательность синтетического пептида (Последовательности, выделенные жирным шрифтом, демонстрируют расщепляемый пептид; * обозначает сайт расщепления)	NAT	RCC	Наиболее ранний момент времени расщепления - NAT	Наиболее ранний момент времени расщепления - RCC
AK-15	RSG**VPLS*LYSG**SGGGK	0	3/5		15 мин
AK-18	RSG**MP*YDLY*HP**SGK	5/5	5/5	15 мин	15 мин
AK-21	RGP**DSGGF*ML*T**SGK	3/5	5/5	15 мин	15 мин
AK-28	RGSG**HEQLTV**SGGSK	0	0		
AK-49	RSG**R*AAAVKSP**SGK	0	3/5		15-60-240 мин
AK-02	RGSG**ISSGLLSGRS*D*N*H**SGK	5/5	5/5	15-60 мин	15-60 мин
AK-50	RG**DLLAVVA*AS**GGK	0	5/5		15-60 мин

AK-88	RGG**ISSGLL*SG*RS**GK	0	5/5		15-60 мин

Было обнаружено, что расщепляемые пептиды DLLAVVA*AS и ISSGLL*SG*RS являлись наиболее специфичными. Последовательности, содержащие данные пептиды, не расщеплялись в культуре NAT, однако расщеплялись при каждом анализе в культуре RCC.

Пример 10

В данном примере применяли следующие конструкции:



Подробная информация о характеристиках домена и последовательностях каждой молекулы АК является следующей.

AK904	1-я полипептидная цепь: Fc(впадина)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVH NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV	DNA158

		EWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	
	2-я полипептидная цепь: Fc(выступ)-IL15 V1 нерасщепляемый (N71Q, N79Q)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT L MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV D GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV L HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK A KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGSSPPGGGSSGG GSG PSGSPGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT LY TESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG DASI HDTVENLIILAQNSLSSNGQVTESGCKECE EL EEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	AK904
AK910	1-я полипептидная цепь: Fc(впадина) CD122(C122S, C168S)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL	DNA440

		TKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQ KSLSLSPGPGSGSAVNGTSQFTCFYNSRA NISCVWSQ DGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELL PVSQASW ACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREG VRWRVMA IQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRSNI SWEISQAS HYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLK QKQEWIS LETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPW SQPLAF RTKPAALGKD	
	2-я полипептидная цепь: Fc(выступ)-IL15 V1 нерасщепляемый (N71Q, N79Q)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT L MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV D GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV L HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK A KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGSSPPGGGSSGG GSG PSGSPGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT	DNA904

		LY TESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG DASI HDTVENLIILAQNSLSSNGQVTESGCKECE EL EEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	
AK932	1-я полипептидная цепь: Fc(впадина) CD122(C122S, C168S)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQ KSLSLSPGPGSGSAVNGTSQFTCFYNSRA NISCVWSQ DGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELL PVSQASW ACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREG VRWRVMA IQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRSNI SWEISQAS HYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLK QKQEWIS LETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPW SQPLAF RTKPAALGKD	DNA440
	2-я полипептидная цепь: Fc(выступ)- [DLLAVVAAS]-IL15	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREE	DNA924

	(N71Q, N79Q) *расщепляемый пептид выделен жирным шрифтом	QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT KNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKS LSLSPGSGS**DLLAVVAAS**SGPGSGNWVN VISDLKKIE DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKC FLLELQVISL ESGDASIHDTVENLIILAQNSLSSNGQVTE SGCKECEE LEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	
AK938	1-я полипептидная цепь: Fc(впадина)-[DLLAVVAAS]-CD122 *расщепляемый пептид выделен жирным шрифтом	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAK TKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSG SPSG**D** **LLAVVAAS**SGPGSGSPAVNGTSQFTCFYN SRANISC VWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQT CELLPV SQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRV LCREGV	DNA822

		RWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVVH VETHRSN ISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWE EAPLLTL KQKQEWISLETLTPDTQYEFQVRVKPLQG EFTT WSPWSQPLAFRTKPAALGKD	
	2-я полипептидная цепь: Fc(выступ)-IL15 V1 нерасщепляемый (N71Q, N79Q)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT L MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV D GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV L HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK A KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGSSPPGGGSSGG GSG PSGSPGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT LY TESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG DASI HDTVENLIILAQNSLSSNGQVTESGCKECE EL EEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	DNA904
AK930	1-я полипептидная цепь: Fc(впадина) CD122(C122S, C168S)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	DNA440

		CKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQ KSLSLSPGPGSGSAVNGTSQFTCFYNSRA NISCVWSQ DGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELL PVSQASW ACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREG VRWRVMA IQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRSNI SWEISQAS HYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLK QKQEWIS LETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPW SQPLAF RTKPAALGKD	
	2-я полипептидная цепь: Fc(выступ)-[ISSGLLSGRS]-IL15 (N71Q, N79Q) *расщепляемый пептид выделен жирным шрифтом	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNA KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GSSGGS P**ISSGLLSGRS**SGPGSGSNWVNVISDLKKI	DNA922

		EDLIQSMH IDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQV ISLESGDA SIHDTVENLIILAQNSLSSNGQVTESGCKE CEELE EKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	
AK936	1-я полипептидная цепь: Fc(впадина)-[ISSGLLSGRS]-CD122	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGPPSGSSP**ISSGLLSG** **RS**SGGGAV NGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDT SCQVHAW PDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGA PDSQKLT TVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFE NLRLMA PISLQVVHVETHRSNISWEISQASHYFERH LEFEAR TLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWISLETLT PDTQYE FQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPA ALGKD	DNA823
	2-я полипептидная цепь: Fc(выступ)-IL15 V1	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT L MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV	DNA904

	нерасщепляемый (N71Q, N79Q)	D GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV L HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK A KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGSSPPGGGSSGG GSG PSGSPGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT LY TESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG DASI HDTVENLIILAQNSLSSNGQVTESGCKECE EL EEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	

Важно отметить, что AK932 и AK930 и их соответствующие «перевернутые» формы AK938 и AK936 предусматривают пептидный субстрат (последовательность которого изображена в прямоугольнике над каждой молекулой и выделена жирным шрифтом в таблице с последовательностями). AK904 представляет собой нерасщепляемую немаскированную конструкцию, и AK910 представляет собой нерасщепляемую маскированную конструкцию, обе из них действуют в качестве отрицательных контролей.

Вышеуказанные молекулы AK содержат домен IL-15, однако, будет понятно, что результаты и выводы, полученные исходя из этих данных, в равной степени относятся к конструкциям IL-2.

Расщепление достигалось в случае маскированных конструкций, предусматривающих пептидный субстрат.

Конструкции инкубировали с MMP7, 9 и 10.Расщепление каждой конструкции анализировали посредством SDS-PAGE и подтверждали посредством биологического анализа HEK-Blue IL-2.

Анализ HEK-Blue выполняли следующим образом.

Условия: планшет для клеток: 96-луночный планшет; плотность клеток: 50000 клеток/лунка; момент времени для выявления с помощью HEK Blue при тестировании: 1 ч;

число конструкций: всего 14 конструкций подвергали тестированию.

Схема анализа

День 1 Разбавляют все конструкции до 1 мкМ с помощью PBS, восстанавливают rhIL-15 до 0,1 мг/мл

Разбавляют rhIL-15 и каждую конструкцию IL-15 до необходимой концентрации

Высевают клетки HEK-Blue при 50000 клеток/лунка, 150 мкл/лунка для 96-луночного планшета

Добавляют 50 мкл разбавленных образцов в предназначенную для них лунку

Заполняют все пустые лунки с помощью PBS, инкубируют при 37°C в 5% CO2 в течение 24 ч

День 2 Получают раствор QUANTI-blue (QB)

180 мкл раствора QB+20 мкл надосадочной жидкости клеток, 37°C в течение 1 часа

Считывание при 625 нМ на планшет-ридере

Результаты показаны в таблице ниже, где «X» обозначает неполное расщепление и «√» обозначает расщепление.

ID	MMP	Расщепление
AK904	7	X
	9	X
	10	X
AK910	7	X
	9	X
	10	X
AK932	7	√
	9	-
	10	-
AK938	7	√
	9	-
	10	-
AK930	7 (36 ч)	√
	9	-
	10	-
AK936	7	√
	9	-
	10	-

Конкретные результаты считывания EC_{50} для биологического анализа HEK-Blue IL-2 показаны в таблице ниже.

ID	MMP	EC50 (пМ)	Макс.
AK904 (1:1:2)	-	14,78	1,44
	7	17,08	1,37
	9	16,00	1,43
	10	22,93	1,45
AK910 (1:1:2)	-	1219,34	1,31
	7	284,17	1,42
	9	519,09	1,40
	10	490,52	1,40
AK932 (1:1:2)	-	2403,11	1,22
	7	9,30	1,43
	9	-	-
	10	-	-
AK938 (1:1:2)	-	885,13	1,31
	7	18,03	1,38
	9	-	-
	10	-	-
AK930 (1:1:2)	-	1858,76	1,22
	7	8,00	1,41
	9	-	-
	10	-	-
AK936 (1:1:2)	-	785,85	1,37
	7	16,11	1,40
	9	-	-
	10	-	-

Результаты SDS-PAGE, представляющие собой изображения геля, показаны на фигурах 53A-D. Результаты биологического анализа HEK-Blue IL-2 показаны на фигурах 54A-F.

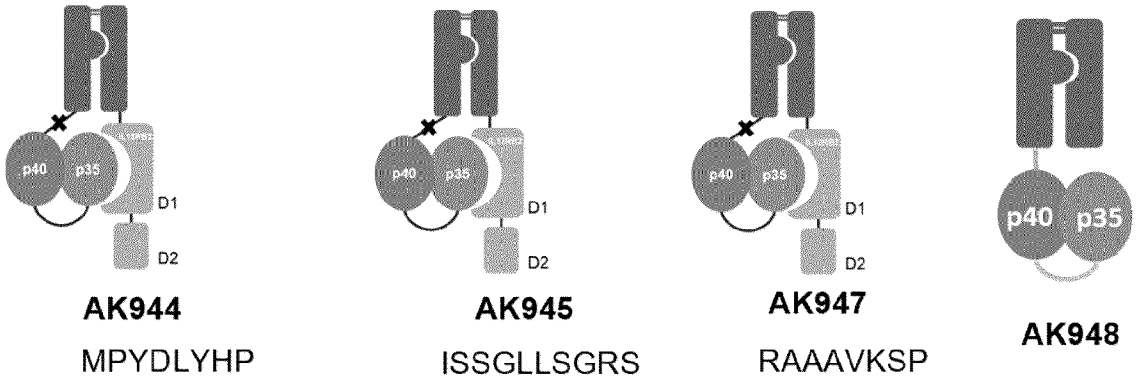
Пример 11

Чтобы понять фармакокинетический и фармакодинамический профиль иллюстративных гибридных муринизированных молекул, нацеленных на опухоль, in vivo, тестировали три молекулы, сконструированные с Fc человека и IL-12 мыши с различными сайтами расщепления.

AK944 (MPYDLYHP), AK945 (ISSGLLSGRS), AK947 (RAAAVKSP) использовали в

2 моделях опухолей, MB49 и B16F10, и исходную AK948 без маскирования использовали в качестве контроля.

Подробности в отношении конструкций, использованных в данном примере, являются следующими.



Последовательности зрелых субъединиц p40 IL-12 и p35 IL-12 мыши и маскирующего компонента IL-12R мыши, используемые в молекулах, являются следующими.

Субъединица p40 IL-12 мыши:

MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTL TITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSG RFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQED VTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEY PDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQ AQDRYYNSSCSKWACVPCRVRS

Субъединица p35 IL-12 мыши:

RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTST LKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAI NAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILL HAFSTRVVTINRVMGYLSSA

Маскирующий компонент IL-12R мыши:

LYHPSGPMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGV IGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKC EAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLDQRDYEK YSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNS QVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQC KGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGGGGSGGGGSGGGGSRVIPVSGPARCL SQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCL ATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDK GMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGY LSSA

Информация о полных последовательностях каждой молекулы показана в таблице ниже (расщепляемые линкеры выделены жирным шрифтом, нерасщепляемые линкеры показаны посредством подчеркивания).

AK944	1-ая полипептидная цепь Впадина: hFc (N297A)-IL12RB2 мыши	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG<u>GGSGGG</u> <u>S</u>GNIDVCKLGTVTVQPAPVIPLGSAANISCSLNP KQGCSHYPSSNELILLKFVNDVLVENLHGKKVH DHTGHSSTFQVTNLSLGMTLFVCKLNCSNSQKK PPVPVCGVEISVGVAPEPPQNISCVQEGENGTV ACSWNSGKVTYLKTNYTLQLSGPNNLTCQKQC FSDNRQNCNRLDLGINLSPDLAESRFIVRVTAI NDLGNSSSLPHTFTFLDIVIPLPPWDIRINFLNA SGSRGTLQWEDEGQVVLNQLRYQPLNSTSWNM VNATNAKGKYDLRDLRPFTEYEFQISSKLHLSG GSWSNWSESLRTRTPEE	DNA909
	2-ая полипептидная цепь Выступ: hFc (N297A)-[MPYDLYHP]-IL12 мыши	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG**GGSGGSGGSMPYDLYHPSGP**MWE LEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEE DDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAG QYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEIL KNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNM DLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVT LDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELA LEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMK	DNA911

		PLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRI QRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQ CKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRV RSGGGGSGGGGSGGGGSRVIPVSGPARCLSQS RNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHE DITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSST TRGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQT EFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQ SLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLH AFSTRVVTINRVMGYLSSA	
AK945	1-ая полипептидная цепь Впадина: hFc (N297A)-IL12RB2 мыши	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG<u>GGSGGG</u> <u>S</u>GNIDVCKLGTVTVQPAPVIPLGSAANISCSLNP KQGCSHYPSSNELILLKFVNDVLVENLHGKKVH DHTGHSSTFQVTNLSLGMTLFVCKLNCSNSQKK PPVPVCGVEISVGVAPEPPQNISCVQEGENGTV ACSWNSGKVTYLKTNYTLQLSGPNNLTCQKQC FSDNRQNCNRLDLGINLSPDLAESRFIVRVTAI NDLGNSSSLPHTFTFLDIVIPLPPWDIRINFLNA SGSRGTLQWEDEGQVVLNQLRYQPLNSTSWNM VNATNAKGKYDLRDLRPFTEYEFQISSKLHLSG GSWSNWSESLRTRTPEE	DNA909
	2-ая полипептидная цепь Выступ: hFc (N297A)-[RAAAVKSP]-IL12 мыши	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**GGSGGSG** **GSISSGLLSGRSSGP**MWELEKDVYVVEVDWTPD	DNA912

		APGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKT LTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKE NGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWL VQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEK VTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALE ARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKN SQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEK MKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQ AQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGGGGSGGGGS GGGGSRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKT AREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPL ELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTL CLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILD KGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPY RVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSA	
AK947	1-ая полипептидная цепь Впадина: hFc (N297A)-IL12RB2 мыши	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGG SGNIDVCKLGTVTVQPAPVIPLGSAANISCSLNP KQGCSHYPSSNELILLKFVNDVLVENLHGKKVH DHTGHSSTFQVTNLSLGMTLFVCKLNCSNSQKK PPVPVCGVEISVGVAPEPPQNISCVQEGENGTV ACSWNSGKVTYLKTNYTLQLSGPNNLTCQKQC FSDNRQNCNRLDLGINLSPDLAESRFIVRVTAI NDLGNSSSLPHTFTFLDIVIPLPPWDIRINFLNA SGSRGTLQWEDEGQVVLNQLRYQPLNSTSWNM VNATNAKGKYDLRDLRPFTEYEFQISSKLHLSG GSWSNWSESLRTRTPEE	DNA909
	2-ая полипептидная цепь	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK	DNA914

	Выступ: hFc (N297A)-[RAAAVKSP]-IL12 мыши	VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP**GGGSGGSGGSRAAAVK** **SPSGP**MWELEKDVYVVEV DWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIG SGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLH KKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCS WLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSA EKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELA LEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPL KNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKK EKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVC VQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGGGGSGGG GSGGGGSRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVK TAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPL E LHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLCL GSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKG M LVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVK M KLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSA	
AK948	1-ая полипептидная цепь Впадина: hFc(N297A)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	DNA158

	2-ая полипептидная цепь Выступ: hFc(N297A)-[DSGGFMLT]-IL12 мыши	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG**GGSGGSGGSDSGGFMLT SGP**MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKN KTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFF IRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTP HSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVE KTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPC RVRSGGGGSGGGGSGGGGSRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITR DQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLP PQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSA	DNA913

В данном исследовании мышам C57BL/6 подкожно инокулировали 1×10^6

опухолевых клеток MB49 или $0,5\times10^6$ опухолевых клеток B16F10. Обработки начинали, когда размеры опухоли достигали 300 мм^3. Введение молекул осуществляли посредством однократных i.v. инъекций при 0,5 или 3 мг/кг. Через пять дней после начала обработки животных подвергали эвтаназии. Регистрировали вес тела и вес органов.

	Тестируемая молекула	Сайт расщепления	M.W. (kDa)	Примерн. дозировка (мг/кг)	Фактическая дозировка (нмоль/кг)	Фактическая дозировка (мг/кг)	Информация о партии
1	Рекомбинантный IL-12 мыши		75	0,5	3,6	0,27	
2	**AK948** (исходная)		110,6	0,1	0,9	0,1	01A
3	**AK948** (исходная)		110,6	0,5	3,6	0,4	01A
4	**AK944**	MPYDLYHP	145,7	1	3,6	0,5	01A
5	**AK945**	ISSGLLSGRS	145,7	1	3,6	0,5	02A
6	**AK947**	RAAAVKSP	145,5	1	3,6	0,5	02A
7	**AK944**	MPYDLYHP	145,7	3	20,6 6	3	01A
8	**AK945**	ISSGLLSGRS	145,7	3	20,6	3	02A
9	**AK947**	RAAAVKSP	145,5	3	20,6	3	02A
10	**Среда-носитель**						

Подробности по PD

- Умерщвление в D5 (всего 50 мышей)
- Иммунофенотипирование: CD8, CD4, Treg, CD25, PD-1, Ki-67, NK, ICOS*
- FACS
  - Кровь, селезенка и опухоль, печень*
  - Быстрая заморозка селезенки, почки, опухоли

* = только B16

Показатели PK

- Терапия начинается при 300 мм^3, (n = 5)
- Однократная доза (i.v.)
- Сбор плазмы крови
  25 мкл: 5 мин, 2 ч, 6 ч, 24 ч, D3, D5
  - PK: захват Fc, выявление Fc в формате MSD
  - ELISA mIFN-γ, D3

Модели:

- MB49
- B16F10*

Подробности по материалам

- C57BL/6 (n = 5 на группу, всего 50)
- Необходимый материал: 2 мг/молекула/модель

Анализировали следующие показатели.

Подавление роста опухоли: объем опухоли значительно уменьшился при применении AK945 и AK947 в модели B16.

Вес опухоли: однократная доза AK945 значительно снижает значения веса опухоли при низкой дозе в модели MB49.

% изменения веса тела: все маскированные молекулы демонстрируют защиту от потери веса тела.

Вес селезенки: значения веса селезенки повышены в модели MB49, но не в модели B16. Разница в весе селезенки в случае группы, обработанной средой-носителем, между моделями могла быть обусловлена конкретной опухолью.

Вес легкого (только для модели MB49): на значения веса легкого не влияют варианты IL-12 в модели MB49.

Результаты показаны на фигурах 55-59.

FACS-анализ также использовали для исследования иммунных ответов в микроокружениях опухоли по сравнению с несколькими периферическими органами, включая кровь и селезенку. Особый интерес представляет активация и/или экспансия CD8

Т-клеток, соотношение CD8/T-reg Т-клеток в микроокружении опухоли.

Анализировали следующие показатели PD.

CD45 в TME

CD8 Т-клетки: количество CD8 Т-клеток увеличивалось в микроокружении опухоли с AK947 при высокой дозе. AK947 также приводит к экспансии периферических CD8 Т-клеток.

*Соотношение CD8:Treg:*соотношение CD8/Treg повышено в микроокружении опухоли.

*Пролиферация CD8 Т-клеток:*нет разницы в пролиферации CD8 Т-клеток в TME. CD8 Т-клетки более пролиферативны в TME, чем по периферии.

Маркер активации CD8: CD8 Т-клетки более активны в микроокружении опухоли.

Результаты показаны на фигурах 60-65.

Наконец, измерение уровня ALT в сыворотке крови мышей осуществляли в день 5; ELISA IFN-γ и TNF-α мышей проводили с применением плазмы крови в день 3 для исследования нисходящей передачи сигнала, активируемой молекулами, нацеленными на опухоль.

Анализировали следующие показатели.

Токсичность - анализ уровня ALT: варианты IL-12 не вызывают токсичности в отношении печени при низкой дозе

Цитокины в сыворотке крови в D3: экспрессия IFNγ в сыворотке крови значительно снижена у мышей, обработанных маскированным IL-12. Имеет место дозозависимое повышение уровня IFN-γ в случае всех вариантов IL-12, однако оно значительно ниже, чем при применении немаскированных исходных молекул. Варианты IL-12 при высоких дозах индуцируют экспрессию TNFα в сыворотке крови, сравнимую с экспрессией при применении исходных молекул, через 3 дня после начала лечения.

PK захват Fc, выявление Fc: выявление PK Fc посредством ELISA не демонстрирует разницы в накоплении лекарственного средства в плазме крови в модели B16. Анализ PK проводили с применением захвата Fc, выявления Fc посредством ELISA.

Результаты показаны на фигурах 66-68.

Пример 12

Целью данного исследования является определение безопасности и сравнение фармакокинетики и фармакодинамики иллюстративных молекул, нацеленных на опухоль, у макаков-крабоедов.

В данном исследовании тестировали три молекулы, содержащие мутации в GAG-связывающем домене, сконструированные с Fc человека и IL-12 человека с различными сайтами расщепления, AK921, AK923, AK667, которые содержат сайты расщепления RAAAVKSP, ISSGLLSGRS и MPYDLYHP соответственно. В качестве положительного контроля используется AK671 - исходная немаскированная молекула с мутацией в GAG-связывающем домене. Структуры этих молекул показаны в примере 8, а точные последовательности показаны в таблицах последовательностей в разделе 10.

Животным посредством внутривенной инъекции будут вводить дозу при 4 мл/кг в дни 0, 7, 14 и 21 при ~ 1,0 мл/мин, всего 4 дозы. Плазму крови будут собирать в различные моменты времени (до дня 56) для полного анализа PK.

Анализ PK будет проводиться с применением захвата Fc, выявления Fc посредством ELISA. Также будет выполняться общий анализ крови, биохимический анализ сыворотки крови. FACS-анализ будет выполняться в день 0 (до введения дозы), день 5 и день 12 для следующих маркеров: CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD45, CD127, CD278, CD159a, FoxP3 и Ki67.

Результаты показаны на приведенных фигурах 69-71.

PK Измерения в тестируемых образцах плазмы крови выполняли с применением технологии Meso Scale Discovery (MSD®), в которой применялись антитело к IgG человека в качестве реагента для захвата и антитело к IgG человека в качестве реагента для выявления. На фигуре 69 показан уровень лекарственного средства в образцах плазмы крови за первые 7 дней.

Определение PD посредством проточной цитометрии Анализ посредством проточной цитометрии выполняли на периферической крови до введения дозы и в различные моменты времени после введения дозы для определения статуса пролиферации T- и NK-клеток. MFI маркера пролиферации Ki-67 оценивали в NK-клетках и CD8 T-клетках, и пиковые изменения наблюдались в день 14 после введения первой дозы. MFI Ki-67 при применении немаскированной AK671 была значительно повышена как в NK-клетках, так и в CD8 T-клетках в крови, тогда как маскированные молекулы не демонстрировали значительной активации периферических NK- или T-клеток. Выполняли однофакторный ANOVA с апостериорным критерием Бонферрони для множественных сравнений для определения статистической значимости обработки по сравнению со средой-носителем (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001). См. результаты на фигуре 70

Общий анализ крови и биохимический анализ сыворотки крови. Общий анализ крови и биохимический анализ сыворотки крови выполняли в день 1 и день 5. (a) Временное снижение абсолютных количеств лимфоцитов (день 1), RBC (день 8) и процентного значения гематокрита (HCT) (день 8) в крови наблюдались во всех группах. Все наблюдения были в пределах нормы как в случае маскированных, так и в случае немаскированных молекул. (b) Немаскированная AK671 повышала уровень ALT, AST и TBILI (биомаркеры функционального теста печени) в сыворотке крови в день 5 после введения первой дозы (незначительно). Маскированные молекулы AK667, AK921 и AK923 демонстрируют относительно более низкие уровни ALT, AST и TBILI в сыворотке крови. См. результаты на фигурах 71A и 71B (стрелки указывают на время введения дозы).

10. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Расщепляемые линкеры

Компонент	**SEQ ID NO**	**Последовательность**	**DC**

N-концевой спейсерный домен	16	GGSGGS	AK380 AK434 AK666 AK667 AK918 AK920 AK924 AK669 AK922
	17	GGSGGSGGS	AK381 AK382 AK383 AK384 AK386 AK446 AK447 AK448 AK528 AK529 AK604 AK605 AK606 AK665 AK668 AK919 AK921 AK925 AK670 AK923
Пептидный субстрат [VPLSLY]	15	VPLS*LY (* обозначает сайт расщепления)	AK380 AK381 AK382 AK383 AK384

				AK386 AK434 AK446 AK447 AK448 AK528 AK529 AK604 AK605 AK606 AK666 AK665
	[MPYDLYHP]	41	MPYD*LYHP (* обозначает сайт расщепления)	AK667 AK668
	[DSGGFMLT]	42	DSGG*FMLT (* обозначает сайт расщепления)	AK918 AK919
	[RAAAVKSP]	43	RAAA*VKSP (* обозначает сайт расщепления)	AK920 AK924 AK921 AK925
	[ISSGLLSGRS]	44	ISSGLL*SGRS (* обозначает сайт расщепления)	AK669 AK922 AK670 AK923
	[DLLAVVAAS]	45	DLLA*VVAAS (* обозначает сайт расщепления)	
С-концевой спейсерный домен		18	SGP	AK380 AK381 AK382 AK383 AK384 AK386

			AK434 AK446 AK447 AK448 AK528 AK529 AK604 AK605 AK606 AK666 AK667 AK918 AK920 AK924 AK669 AK922 AK665 AK668 AK919 AK921 AK925 AK670 AK923
Расщепляемый линкер (L2)	19	GGSGGSVPLSLYSGP	AK380 AK434 AK666
	20	GGSGGSGGSVPLSLYSGP	AK381 AK382 AK383 AK384 AK386 AK446 AK447 AK448 AK604

			AK605 AK606 AK665
	46	GGSGGSMPYDLYHPSGP	AK667
	47	GGSGGSGGSMPYDLYHPSGP	AK668
	48	GGSGGSDSGGFMLTSGP	AK918
	49	GGSGGSGGSDSGGFMLTSGP	AK919
	50	GGSGGSRAAAVKSPSGP	AK920 AK924
	51	GGSGGSGGSRAAAVKSPSGP	AK921 AK925
	52	GGSGGSISSGLLSGRSSGP	AK669 AK922
	53	GGSGGSGGSISSGLLSGRSSGP	AK670 AK923

Нерасщепляемые линкеры

Название компонента	**SEQ ID NO**	**Последовательность**	**DC**
Нерасщепляемый линкер (L1)	12	GGGGS	AK448
	13	GGGGSGGGGS	AK380 AK381 AK382 AK383 AK384 AK386 AK434 AK446 AK528 AK529 AK604 AK605 AK606

			AK663
	14	GGSGGGSG	AK447 AK598 AK600 AK601 AK924 AK922 AK925 AK923
	54	GGSGGSGGSGGSGGSSGP	AK598 AK600 AK601 AK664 AK671
	55	PGGSGP	AK666 AK667 AK918 AK920 AK669
	56	GGSPG	AK665 AK668 AK919 AK921 AK670 AK664

Цитокины

Компонент		**SEQ ID NO**	**Последовательность**	**Молекула**
hIL12B	Субъединица p40 IL-12 Субъединица p40 IL-12 [KDNTE	1	IWELKKDVYVVELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITWTLDQS SEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQ YTCHKGGEVLSHSLLLLHKKED GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRC EAKNYSGRFTCWWLTTISTDLT FSVKSSRGSSDPQGVTCGAATL	AK380 AK381 AK382 AK383 AK384 AK386 AK434

RV] IL-12 Субъединица p40 [KDNTEGRV] Субъединица p40 IL-12 [C252S]		SAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWS TPHSYFSLTFCVQVQGKSKREK KDRVFTDKTSATVICRKNASIS VRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	AK446 AK447 AK448 AK528 AK529 AK598 AK604
	57	IWELKKDVYVVELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITW TLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFG DAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDP QGVTCGAATLSAERV RGDNKEYEYSVECQEDSACPA AEESLPIEVMVDAVHKLKYENY TSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFCVQVQGKDNT ERVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSE WASVPCS	AK601
	58	IWELKKDVYVVELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITW TLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFG DAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDP QGVTCGAATLSAERV RGDNKEYEYSVECQEDSACPA AEESLPIEVMVDAVHKLKYENY TSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT	AK600

		WSTPHSYFSLTFCVQVQGKDNTEGRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	
	59	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	AK605 AK606
Субъединица p40 [KDNTEGRV] + [C252S]	60	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEGRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	AK666 AK667 AK918 AK920 AK924 AK669 AK922 AK665 AK668 AK919 AK921 AK925 AK670 AK923 AK671 AK664
Линкер	3	GGGGSGGGGSGGGGS	AK380

			AK381 AK382 AK383 AK384 AK386 AK434 AK446 AK447 AK448 AK528 AK529 AK598 AK600 AK601 AK604 AK605 AK606 AK666 AK667 AK918 AK920 AK924 AK669 AK922 AK665 AK668 AK919 AK921 AK925 AK670 AK923 AK671 AK664 AK944 AK945

				AK947 AK948
hIL12A	Субъединица p35 IL-12	2	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNL LRAVSNMLQKARQTLEFYPCTS EEIDHEDITKDKTSTVEACLPLE LTKNESCLNSRETSFITNGSCLA SRKTSFMMALCLSSIYEDLKMY QVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	AK380 AK381 AK382 AK383 AK384 AK386 AK434 AK446 AK447 AK448 AK528 AK529 AK598 AK600 AK601 AK604 AK605 AK606 AK666 AK667 AK918 AK920 AK924 AK669 AK922 AK665 AK668 AK919 AK921 AK925 AK670 AK923 AK671

				AK664
Домен цитокина	hIL12B-hIL12A hIL12B-hIL12A [KDNTERV] hIL12B-hIL12A [KDNTEGRV]	4	IWELKKDVYVVELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITWTLDQS SEVLGSGKTLTIQVKEFGD AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKT FLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYS VECQEDSACPAAEESLPIEV MVDAVHKLKYENYTSSFFIRDII KPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVS WEYPDTWSTPHSYFSLTF CVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCSGGGGS GGGGSGGGGSRNLPVATPDPG MFPCLHHSQNLLRAVSNMLQK ARQTLEFYPCTSEEIDHE DITKDKTSTVEACLPLELTKNES CLNSRETSFITNGSCLASRKTSF MMALCLSSIYEDLKMYQVE FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQK SSLEEPDFYKTKIKLCILLHA FRIRAVTIDRVMSYLNAS	AK380 AK381 AK382 AK383 AK384 AK386 AK434 AK446 AK447 AK448 AK528 AK529 AK598 AK604
		61	IWELKKDVYVVELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITWTLDQS SEVLGSGKTLTIQVKEFGD AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKT FLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYS VECQEDSACPAAEESLPIEV	AK601

			MVDAVHKLKYENYTSSFFIRDII KPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVS WEYPDTWSTPHSYFSLTF CVQVQGKDNTERVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGS GGGGSGGGGSRNLPVATPDPG MFPCLHHSQNLLRAVSNMLQK ARQTLEFYPCTSEEIDHE DITKDKTSTVEACLPLELTKNES CLNSRETSFITNGSCLASRKTSF MMALCLSSIYEDLKMYQVE FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQK SSLEEPDFYKTKIKLCILLHA FRIRAVTIDRVMSYLNAS		
		62	IWELKKDVYVVELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITWTLDQS SEVLGSGKTLTIQVKEFGD AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKT FLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYS VECQEDSACPAAEESLPIEV MVDAVHKLKYENYTSSFFIRDII KPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVS WEYPDTWSTPHSYFSLTF CVQVQGKDNTEGRVFTDKTSA TVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCSGGGGS GGGGSGGGGSRNLPVATPDPG MFPCLHHSQNLLRAVSNMLQK ARQTLEFYPCTSEEIDHE DITKDKTSTVEACLPLELTKNES	AK600	

			CLNSRETSFITNGSCLASRKTSF MMALCLSSIYEDLKMYQVE FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQK SSLEEPDFYKTKIKLCILLHA FRIRAVTIDRVMSYLNAS	
	hIL12B- hIL12A [C252S]	63	IWELKKDVYVVELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITWTLDQS SEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQ YTCHKGGEVLSHSLLLLHKKED GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRC EAKNYSGRFTCWWLTTISTDLT FSVKSSRGSSDPQGVTCGAATL SAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWS TPHSYFSLTFSVQVQGKSKREK KDRVFTDKTSATVICRKNASIS VRAQDRYYSSSWSEWASVPCS GGGGSGGGGSGGGGSRNLPVA TPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSN MLQKARQTLEFYPCTSEEIDHE DITKDKTSTVEACLPLELTKNES CLNSRETSFITNGSCLASRKTSF MMALCLSSIYEDLKMYQVEFK TMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIR AVTIDRVMSYLNAS	AK605 AK606

	hIL12B-hIL12A [KDNTEGRV] + [C252S]	64	IWELKKDVYVVELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITWTLDQS SEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQ YTCHKGGEVLSHSLLLLHKKED GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRC EAKNYSGRFTCWWLTTISTDLT FSVKSSRGSSDPQGVTCGAATL SAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWS TPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEG RVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYYSSSWSEWASVPCSGGG GSGGGGSGGGGSRNLPVATPDP GMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQ KARQTLEFYPCTSEEIDHEDITK DKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMM ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVID ELMQALNFNSETVPQKSSLEEP DFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNAS	AK666 AK667 AK918 AK920 AK924 AK669 AK922 AK665 AK668 AK919 AK921 AK925 AK670 AK923 AK671 AK664

Маскирующие компоненты

Компонент		**SEQ ID NO**	**Последовательность**	**DC**
Маскирующий компонент (MM)	hCD212(24-237)	5	CRTSECCFQDPPYPDADSGSASGP RDLRCYRISSDRYECSWQYEGPTA GVSHFLRCCLSS GRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVS VLYTVTLWVESWARNQTEKSPEV TLQLYNSVKYEP PLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDN QVGAEVQFRHRTPSSPWKLGDCG	AK384

		PQDDDTESCLC PLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSS WSKWSSPVCVPPENP	
hCD212(24-545)	6	CRTSECCFQDPPYPDADSGSASGP RDLRCYRISSDRYECSWQYEGPTA GVSHFLRCCLS SGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVS VLYTVTLWVESWARNQTEKSPEV TLQLYNSVKYEP PLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDN QVGAEVQFRHRTPSSPWKLGDCG PQDDDTESCLCP LEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSW SKWSSPVCVPPENPPQPQVRFSVE QLGQDGRRRL TLKEQPTQLELPEGCQGLAPGTEV TYRLQLHMLSCPCKAKATRTLHL GKMPYLSGAAY NVAVISSNQFGPGLNQTWHIPADT HTEPVALNISVGTNGTTMYWPAR AQSMTYCIEW QPVGQDGGLATCSLTAPQDPDPA GMATYSWSRESGAMGQEKCYYIT IFASAHPEKLTL WSTVLSTYHFGGNASAAGTPHHV SVKNHSLDSVSVDWAPSLLSTCPG VLKEYVVRCRDE DSKQVSEHPVQPTETQVTLSGLRA GVAYTVQVRADTAWLRGVWSQP QRFSIEVQVSD	AK380 AK381 AK382
IL12RB2(24-212)	7	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTV NITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYK FDRRINFHHGHSL NSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSD EIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQ	AK528

		KGEQGTVACTWE RGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTW QKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSL GSSSSL	
IL12RB2(24-222)	8	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTV NITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYK FDRRINFHHGHSLN SQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEI QICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKG EQGTVACTWER GRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQ KQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGS SSSLPSTFTFLDIV	AK446
IL12RB2(24-319)	9	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTV NITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYK FDRRINFHHGHSL NSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSD EIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQ KGEQGTVACTW ERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLT WQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESP ESNFTAKVTAVNSL GSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRI KFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLN RLRYRPSNSRLWNM VNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEF QISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQT PEE	AK386 AK434 AK447
			AK448 AK598 AK600 AK601 AK605
IL12RB2(24-319)[C242S]	65	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTV NITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYK FDRRINFHHGHSL NSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSD EIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQ	AK604 AK606 AK666 AK667 AK918

			KGEQGTVACTWER GRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQ KQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLG SSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKF QKASVSRSTLYWRDEGLVLLNRL RYRPSNSRLWNM VNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEF QISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQT PEE	AK920 AK924 AK669 AK922 AK665 AK668 AK919 AK921 AK925 AK670 AK923 AK663 AK664
	IL12RB2(24-622)	10	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTV NITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYK FDRRINFHHGHSLNS QVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQ ICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGE QGTVACTWERGR DTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQ CKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFT AKVTAVNSLGSSSSL PSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKAS VSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRP SNSRLWNMVNVTK AKGRHDLLDLKPFTEYEFQISSKL HLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPT GMLDVWYMKRHID YSRQQISLFWKNLSVSEARGKILH YQVTLQELTGGKAMTQNITGHTS WTTVIPRTGNWAVA VSAANSKGSSLPTRINIMNLCEAG LLAPRQVSANSEGMDNILVTWQPP RKDPSAVQEYVVE WRELHPGGDTQVPLNWLRSRPYN	AK383

			VSALISENIKSYICYEIRVYALSGD QGGCSSILGNSKHKAP LSGPHINAITEEKGSILISWNSIPVQ EQMGCLLHYRIYWKERDSNSQPQ LCEIPYRVSQNSHPIN SLQPRVTYVLWMTALTAAGESSH GNEREFCLQGKAN	
	IL12RB2(24-227)	11	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTV NITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYK FDRRINFHHGHSLNSQVTG LPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGA EIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGT VACTWERGRDTHLYTEYTL QLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLD FGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLG SSSSLPSTFTFLDIVRPLPP	AK529

Домены, обеспечивающие увеличение периода полужизни

Компонент		**SEQ ID NO**	**Последовательность**	**DC**
1-ый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни (HL1)	Впадина: hFc(N297A)	25	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP E VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	AK380 AK381 AK382 AK383 AK384 AK386 AK434 AK446 AK447 AK448 AK528 AK529 AK598 AK600 AK601 AK604

				AK605 AK606 AK666 AK667 AK918 AK920 AK924 AK669 AK922 AK665 AK668 AK919 AK921 AK925 AK670 AK923 AK671 AK663 AK664
2-ой домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни (HL2)	Выступ: hFc(N297A)	26	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	AK380 AK381 AK382 AK383 AK384 AK386 AK434 AK446 AK447 AK448 AK528 AK529 AK598 AK600 AK601 AK604

			AK605 AK606 AK666 AK667 AK918 AK920 AK924 AK669 AK922 AK665 AK668 AK919 AK921 AK925 AK670 AK923 AK671 AK663 AK664
Константная область тяжелой цепи гамма 1 IgG1 человека	21	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL	

		SLSPGK	
Константная область тяжелой цепи гамма 1 IgG1 человека, Fc-домен	22	DKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG	
Константная область тяжелой цепи гамма 1 IgG1 человека, Fc-домен (Y349C; T366S; L38A и Y407V)	23	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	
Константная область тяжелой цепи гамма 1 IgG1 человека, Fc-домен (S354C и T366W)	24	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL	

		YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	
Константная область тяжелой цепи гамма 1 IgG1 человека, Fc-домен (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A)	27	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHED P EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK E YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG	
Константная область тяжелой цепи гамма 1 IgG1 человека, Fc-домен (S354C, T366W, N297A и I253A)	28	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHED P EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG	

Продукты расщепления

Продукт, высвобождаемый посредством расщепления	**SEQ ID NO**	**DC**
LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITW TLDQSSEVLGSG KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDI	29	AK380 AK381 AK383

LKDQKEPKNKTFL RCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAA TLSAERVRGDN KEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFF IRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREK KDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPD PGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDIT KDKTSTVEACLP LELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLK MYQVEFKTMNAK LLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHA FRIRAVTIDRVMSYLNAS		AK434 AK447 AK448 AK528 AK529 AK382 AK384 AK386 AK446 AK604
LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITW TLDQSSEVLGSG KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDI LKDQKEPKNKTFL RCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAA TLSAERVRGDNK EYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFI RDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVI CRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGG SRNLPVATPDPGMF PCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKT STVEACLPLELTKN ESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEF KTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKL CILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNAS	66	AK605 AK606

LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITW TLDQSSEVLGSG KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDI LKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVRGDN KEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFF IRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEG RVFTDKTSATVI CRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGG SRNLPVATPDPG MFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKD KTSTVEACLPLE LTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMY QVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYK TKIKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNAS	67	AK665
LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITW TLDQSSEVLGSG KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDI LKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVRGDN KEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFF IRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEG RVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGS RNLPVATPDPGM FPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDK TSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQ VEFKTMNAKLLM	68	AK666

DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKT KIKLCILLHAFRIR AVTIDRVMSYLNAS		
LYHPSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTC GAATLSAERVRG DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNT EGRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDP GMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITK DKTSTVEACLPLE LTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMY QVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYK TKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNAS	69	AK667
LYHPSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTC GAATLSAERVRG DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNT EGRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGS RNLPVATPDPGMF PCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKT	70	AK668

STVEACLPLELTKNE SCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFK TMNAKLLMDPKR QIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLC ILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNAS		
SGRSSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNKT FLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNL QLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTE GRVFTDKTSATV ICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGG GSRNLPVATPDPG MFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKD KTSTVEACLPLEL TKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQ VEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYK TKIKLCILLHAFR IRAVTIDRVMSYLNAS	71	AK669
SGRSSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNKT FLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDN KEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFF IRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEG RVFTDKTSATVIC	72	AK670

RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGS RNLPVATPDPGM FPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDK TSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQ VEFKTMNAKLLMD PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI KLCILLHAFRIRA VTIDRVMSYLNAS		
SGRSSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNKT FLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNL QLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTE GRVFTDKTSATVI CRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGG SRNLPVATPDPG MFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKD KTSTVEACLPLEL TKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQ VEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYK TKIKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNAS	73	AK922
SGRSSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVRGDNK EYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFI	74	AK923

RDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEGR VFTDKTSATVICRK NASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRN LPVATPDPGMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTV EACLPLELTKNESC LNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKT MNAKLLMDPKRQIF LDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRV MSYLNAS		
FMLTSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTC GAATLSAERVRG DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDIIKPDPPK NLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDN TEGRVFTDKTSA TVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSG GGGSRNLPVATPD PGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDIT KDKTSTVEACLP LELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLK MYQVEFKTMNA KLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPD FYKTKIKLCILLH AFRIRAVTIDRVMSYLNAS	75	AK918
FMLTSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNKTF	76	AK919

LRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVRGDNK EYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFI RDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEGR VFTDKTSATVICR KNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFP CLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTS TVEACLPLELTKNE SCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFK TMNAKLLMDPKR QIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLC ILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNAS		
VKSPSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWTLDQSSEVLGSG KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDI LKDQKEPKNKTFLR CEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAAT LSAERVRGDNKEY EYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEGRVFT DKTSATVICRKNAS ISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPV ATPDPGMFPCLHH SQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNA KLLMDPKRQIFLDQ NMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNAS	77	AK920
VKSPSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWTLDQSSEVLGSG	78	AK921

KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDI LKDQKEPKNKTFLR CEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAAT LSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDII KPDPPKNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEGRVFTDK TSATVICRKNASISV RAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATP DPGMFPCLHHSQNLL RAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLEL TKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLA VIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRA VTIDRVMSYLNAS		
VKSPSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNKT FLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDN KEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFF IRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEG RVFTDKTSATVICR KNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFP CLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTS TVEACLPLELTKNE SCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFK TMNAKLLMDPKR QIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLC ILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNAS	79	AK924

VKSPSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNKT FLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDN KEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFF IRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEG RVFTDKTSATVICR KNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFP CLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTS TVEACLPLELTKNESC LNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKT MNAKLLMDPKRQIF LDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRV MSYLNAS	80	AK925

Полные последовательности

Компонент		**SEQ ID NO**	**Полная последовательность**	**DC**	
HL1-L1-MM	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-237)	30	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGSCRTSECCFQDP	AK384	DNA410

			PYPDADSGSASGPRDLRCYRIS SDRYECSWQYEGP TAGVSHFLRCCLSSGRCCYFA AGSATRLQFSDQAGVSVLYTV TLWVESWARNQTEK SPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIK VSKLAGQLRMEWETPDNQVG AEVQFRHRTPSSP WKLGDCGPQDDDTESCLCPLE MNVAQEFQLRRRQLGSQGSS WSKWSSPVCVPPENP		
	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-545)	31	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYT QKSLSLSPGGGGGSGGGGSCR TSECCFQDPPYPDADSGSASGP RDLRCYRISSD RYECSWQYEGPTAGVSHFLRC CLSSGRCCYFAAGSATRLQFS DQAGVSVLYTVT LWVESWARNQTEKSPEVTLQ LYNSVKYEPPLGDIKVSKLAG QLRMEWETPDN QVGAEVQFRHRTPSSPWKLG DCGPQDDDTESCLCPLEMNV AQEFQLRRRQLG	AK380 AK381 AK382	DNA409

			SQGSSWSKWSSPVCVPPENPP QPQVRFSVEQLGQDGRRRLTL KEQPTQLELPE GCQGLAPGTEVTYRLQLHML SCPCKAKATRTLHLGKMPYLS GAAYNVAVISSNQ FGPGLNQTWHIPADTHTEPVA LNISVGTNGTTMYWPARAQS MTYCIEWQPVGQ DGGLATCSLTAPQDPDPAGM ATYSWSRESGAMGQEKCYYI TIFASAHPEKLTLWS TVLSTYHFGGNASAAGTPHHV SVKNHSLDSVSVDWAPSLLST CPGVLKEYVVRC RDEDSKQVSEHPVQPTETQVT LSGLRAGVAYTVQVRADTAW LRGVWSQPQRF SIEVQVSD		
	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-212)	32	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSKIDACKRGD VTVKPSHVILLGSTVNITCSLK PRQGCFHYSRRNKLI LYKFDRRINFHHGHSLNSQVT	AK528	DNA629

			GLPLGTTLFVCKLACINSDEIQI CGAEIFVGVAPEQP QNLSCIQKGEQGTVACTWER GRDTHLYTEYTLQLSGPKNLT WQKQCKDIYCDYLDF GINLTPESPESNFTAKVTAVNS LGSSSSL		
	Впадина: hFc(N297 A)-IL12RB2(24-222)	33	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGGGGG SGGGGSKIDACKRGDVTVKPS HVILLGSTVNITCSLKPRQGCF HYSRRNKLILYKFDRRI NFHHGHSLNSQVTGLPLGTTL FVCKLACINSDEIQICGAEIFVG VAPEQPQNLSCIQKGEQ GTVACTWERGRDTHLYTEYT LQLSGPKNLTWQKQCKDIYC DYLDFGINLTPESPESNFT AKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFL DIV	AK446	DNA539
	Впадина:	34	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL	AK386	DNA426

	hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)		FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE	AK434 AK605	
		35	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK	AK448	DNA541

			GFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSKIDAC KRGDVTVKPSHVILLGSTVNIT CSLKPRQGCFHY SRRNKLILYKFDRRINFHHGHS LNSQVTGLPLGTTLFVCKLACI NSDEIQICGAEIFV GVAPEQPQNLSCIQKGEQGTV ACTWERGRDTHLYTEYTLQLS GPKNLTWQKQ CKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTF TFLDIVRPLPPW DIRIKFQKASVSRCTLYWRDE GLVLLNRLRYRPSNSRLWNM VNVTKAKGRHDL LDLKPFTEYEFQISSKLHLYKG SWSDWSESLRAQTPEE		
		36	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGGGSGGG SGKIDACKRGDVTVKPSHVIL	AK447 AK598 AK600 AK601	DNA540

			LGSTVNITCSLKPR QGCFHYSRRNKLILYKFDRRI NFHHGHSLNSQVTGLPLGTTL FVCKLACINSDEIQI CGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQK GEQGTVACTWERGRDTHLYT EYTLQLSGPKN LTWQKQCKDIYCDYLDFGINL TPESPESNFTAKVTAVNSLGSS SSLPSTFTFLDIV RPLPPWDIRIKFQKASVSRCTL YWRDEGLVLLNRLRYRPSNSR LWNMVNVTK AKGRHDLLDLKPFTEYEFQISS KLHLYKGSWSDWSESLRAQT PEE		
	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-622)	37	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSKIDACKRGD VTVKPSHVIL LGSTVNITCSLKPRQGCFHYSR RNKLILYKFDRRINFHHGHSL NSQVTGLPLG TTLFVCKLACINSDEIQICGAEI	AK383	DNA425

			FVGVAPEQPQNLSCIQKGEQG TVACTWER GRDTHLYTEYTLQLSGPKNLT WQKQCKDIYCDYLDFGINLTP ESPESNFTAK VTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIV RPLPPWDIRIKFQKASVSRCTL YWRDEGLV LLNRLRYRPSNSRLWNMVNV TKAKGRHDLLDLKPFTEYEFQ ISSKLHLYKGS WSDWSESLRAQTPEEEPTGML DVWYMKRHIDYSRQQISLFW KNLSVSEAR GKILHYQVTLQELTGGKAMT QNITGHTSWTTVIPRTGNWAV AVSAANSKG SSLPTRINIMNLCEAGLLAPRQ VSANSEGMDNILVTWQPPRK DPSAVQEYVV EWRELHPGGDTQVPLNWLRS RPYNVSALISENIKSYICYEIRV YALSGDQGGC SSILGNSKHKAPLSGPHINAITE EKGSILISWNSIPVQEQMGCLL HYRIYWKER DSNSQPQLCEIPYRVSQNSHPI NSLQPRVTYVLWMTALTAAG ESSHGNERE FCLQGKAN		
	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-227)	38	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWL	AK529	DNA644

			NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGGGGGSG GGGSKIDACKRGDVTVKPSHV ILLGSTVNITCS LKPRQGCFHYSRRNKLILYKF DRRINFHHGHSLNSQVTGLPL GTTLFVCKLACIN SDEIQICGAEIFVGVAPEQPQN LSCIQKGEQGTVACTWERGRD THLYTEYTLQL SGPKNLTWQKQCKDIYCDYL DFGINLTPESPESNFTAKVTAV NSLGSSSSLPSTF TFLDIVRPLPP		
	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)[C242S]	81	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGG SGGGGSKIDACKRGDVTVKPS HVILLGSTVNI	AK604 AK606	DNA720

			TCSLKPRQGCFHYSRRNKLIL YKFDRRINFHHGHSLNSQVTG LPLGTTLFVCK LACINSDEIQICGAEIFVGVAPE QPQNLSCIQKGEQGTVACTWE RGRDTHLYTE YTLQLSGPKNLTWQKQCKDIY CDYLDFGINLTPESPESNFTAK VTAVNSLGSSS SLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIK FQKASVSRSTLYWRDEGLVLL NRLRYRPSNSR LWNMVNVTKAKGRHDLLDL KPFTEYEFQISSKLHLYKGSWS DWSESLRAQTPEE		
	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)[C242S]	82	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGGGSPGKI DACKRGDVTVKPSHVILLGST VNITCSLKPRQ GCFHYSRRNKLILYKFDRRINF HHGHSLNSQVTGLPLGTTLFV CKLACINSDEI QICGAEIFVGVAPEQPQNLSCI QKGEQGTVACTWERGRDTHL	AK665 AK668 AK670 AK919 AK921	DNA835

			YTEYTLQLSGP KNLTWQKQCKDIYCDYLDFGI NLTPESPESNFTAKVTAVNSL GSSSSLPSTFTFL DIVRPLPPWDIRIKFQKASVSR STLYWRDEGLVLLNRLRYRPS NSRLWNMVNVT KAKGRHDLLDLKPFTEYEFQI SSKLHLYKGSWSDWSESLRA QTPEE		
	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319) [C242S]	83	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGPGGS GPKIDACKRGDVTVKPSHVIL LGSTVNITCSLK PRQGCFHYSRRNKLILYKFDR RINFHHGHSLNSQVTGLPLGT TLFVCKLACINS DEIQICGAEIFVGVAPEQPQNL SCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLS GPKNLTWQKQCKDIYCDYLD FGINLTPESPESNFTAKVTAVN SLGSSSSLPSTF TFLDIVRPLPPWDIRIKFQKAS	AK666 AK667 AK669 AK918 AK920	DNA838

			VSRSTLYWRDEGLVLLNRLRY RPSNSRLWNM VNVTKAKGRHDLLDLKPFTE YEFQISSKLHLYKGSWSDWSE SLRAQTPEE		
	Впадина: hFc(N297 A)-IL12RB2(24-319) [C242S]	84	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGG GSGGGSGKIDACKRGDVTVKP SHVILLGSTVNI TCSLKPRQGCFHYSRRNKLIL YKFDRRINFHHGHSLNSQVTG LPLGTTLFVCKL ACINSDEIQICGAEIFVGVAPE QPQNLSCIQKGEQGTVACTWE RGRDTHLYTEY TLQLSGPKNLTWQKQCKDIYC DYLDFGINLTPESPESNFTAKV TAVNSLGSSS SLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIK FQKASVSRSTLYWRDEGLVLL NRLRYRPSNSR LWNMVNVTKAKGRHDLLDL KPFTEYEFQISSKLHLYKGSWS DWSESLRAQTPEE	AK922 AK923 AK924 AK925	DNA915

HL2-L2-C	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	39	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGSGGSVPLSLYSGP IWELKKDVYVVELDWYPDAP GEMVVLTCDTPEED GITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQ VKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HSLLLLHKKEDGIWS TDILKDQKEPKNKTFLRCEAK NYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTC GAATLSAERVRGDNKEYEYS VECQEDSACPAAEESLPIEVM VDAVHKLKYENYTSSFF IRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSR QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSL TFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISV RAQDRYYSSSWSEWASVPCS GGGGSGGGGSGGGG SRNLPVATPDPGMFPCLHHSQ NLLRAVSNMLQKARQTLEFYP CTSEEIDHEDITKDKT STVEACLPLELTKNESCLNSRE TSFITNGSCLASRKTSFMMAL	AK380 AK434	DNA406

			CLSSIYEDLKMYQVEFK TMNAKLLMDPKRQIFLDQNM LAVIDELMQALNFNSETVPQK SSLEEPDFYKTKIKL CILLHAFRIRAVTIDRVMSYLN AS		
	Выступ: hFc(N297 A)- [VPLSLY] -hIL12B- hIL12A	40	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGSGGSG GSVPLSLYSGPIWELKKDVYV VELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITWTLDQ SSEVLGSGKTLTIQVKEFGDA GQYTCHKGGEV LSHSLLLLHKKEDGIWSTDILK DQKEPKNKTFLRCEAKNYSGR FTCWWLTTISTD LTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVRGDNKEYEYSVEC QEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHKLKYENYTSS FFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNS RQVEVSWEYPDT	AK381 AK383 AK384 AK386 AK446 AK447 AK448 AK528 AK529 AK604 AK382	DNA407 DNA408

			WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSK REKKDRVFTDKTSATVICRKN ASISVRAQDRYYSS SWSEWASVPCSGGGGSGGGG SGGGGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRA VSNMLQKARQTLEFYPCTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLEL TKNESCLNSRETS FITNGSCLASRKTSFMMALCL SSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQ NMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEEPDFYKTKIKLCILLH AFRIRAVTIDRVM SYLNAS		
	Выступ: hFc(N297A)-[нерасщепляемый]-IL-12	85	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGSGGSGGSGGSG GSSGPIWELKKDVYVVELDW YPDAPGEMVVLTCDTPEED GITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQ VKEFGDAGQYTCHKGGEVL SHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNYSG RFTCWWLTTISTDLTFSVKSSR	AK598	DNA707

			GSSDPQGVTCGAATLSAERV RGDNKEYEYSVECQEDSACPA AEESLPIEVMVDAVHKLKYE NYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWS TPHSYFSLTFCVQVQGKSKRE KKDRVFTDKTSATVICRKNAS ISVRAQDRYYSSSWSEWASVP CSGGGGSGGGGSGGGGSRNL PVATPDPGMFPCLHHSQNLLR AVSNMLQKARQTLEFYPCTSE E IDHEDITKDKTSTVEACLPLEL TKNESCLNSRETSFITNGSCLA SRKT SFMMALCLSSIYEDLKMYQVE FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQ NML AVIDELMQALNFNSETVPQKS SLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RA VTIDRVMSYLNAS		
	Выступ: hFc(N297A)-[нерасщепляемый]-IL-12, мутантный GAG-связывающий домен, KDNTERV	86	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVS VL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGSGGSG GSGGSGGSSGPIWELKKDVYV	AK600	DNA708

			V ELDWYPDAPGEMVVLTCDTP EEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LT IQVKEFGDAGQYTCHKGGEV LSHSLLLLHKKEDGIWSTDILK DQ KEPKNKTFLRCEAKNYSGRFT CWWLTTISTDLTFSVKSSRGSS D PQGVTCGAATLSAERVRGDN KEYEYSVECQEDSACPAAEES LP IEVMVDAVHKLKYENYTSSFF IRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSR QV EVSWEYPDTWSTPHSYFSLTF CVQVQGKDNTERVFTDKTSA TV ICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGSGGGGSG G GGSRNLPVATPDPGMFPCLHH SQNLLRAVSNMLQKARQTLEF Y PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA CLPLELTKNESCLNSRETSFIT NGS CLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQI FLDQNMLAVIDELMQALNFNS ETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLC IL LHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS		

	Выступ: hFc(N297A)-[нерасщепляемый]-IL-12, мутантный GAG-связывающий домен, KDNTEGRV	87	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GSGGSGGSGGSGGSSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGE VLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFT CWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEY EYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKP DPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGK DNTEGRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWAS	AK601	DNA709

			VPCSG GGGSGGGGSGGGGSRNLPVA TPDPGMFPCLHHSQNLLRAVS NMLQ KARQTLEFYPCTSEEIDHEDIT KDKTSTVEACLPLELTKNESC LNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALC LSSIYEDLKMYQVEFKTMNAK LLMDP KRQIFLDQNMLAVIDELMQAL NFNSETVPQKSSLEEPDFYKTK IKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS		
	Выступ: hFc(N297 A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A [C252S]	88	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELT KNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGSGGSGG SVPLSLY SGPIWELKKDVYVVELDWYP DAPGEMVVLTCDTPEEDGITW TLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQY TCHKGGEVLSHSLLLLHKKED GIWSTD	AK605 AK606	DNA719

		ILKDQKEPKNKTFLRCEAKNY SGRFTCWWLTTISTDLTFSVKS SRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDN KEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMV DAVHKLKYENYTSSFFIRDIIK PDPPKNLQLKPLKNSRQVEVS WEYPDT WSTPHSYFSLTFSVQVQGKSK REKKDRVFTDKTSATVICRKN ASISVRA QDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGGSGGGGSRNLPVATP DPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQ TLEFYPCTSEEIDHEDITKDKT STVEACL PLELTKNESCLNSRETSFITNG SCLASRKTSFMMALCLSSIYE DLKMYQV EFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQ NMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEE PDFYKTKIKLCILLHAFRIRAV TIDRVMSYLNAS		
Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLYSG]-IL-12 (p40C252S), мутантный GAG-	89	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWC	AK665	DNA830

связывающий домен, KDNTEGRV		LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSGGSVPLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEGRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTK		

		IKLCILLH AFRIRAVTIDRVMSYLNAS		
Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLYSG]-IL-12 (p40C252S), мутантный GAG-связывающий домен, KDNTEGRV	90	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGSGGSVPLSLYSG PIWELKKD VYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSH SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFLR CEAKNYSGRFTCWWLTTISTD LTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPA AEESLPIEVMVDAVHKLKYEN YTSSFFIRDII KPDPPKNLQLKPLKNSRQVEV SWEYPDTWSTPHSYFSLTFSV QVQGKDNT EGRVFTDKTSATVICRKNASIS	AK666	DNA831

		VRAQDRYYSSSWSEWASVPC SGGGGSGGG GSGGGGSRNLPVATPDPGMFP CLHHSQNLLRAVSNMLQKAR QTLEFYPCT SEEIDHEDITKDKTSTVEACLP LELTKNESCLNSRETSFITNGS CLASRKTSFM MALCLSSIYEDLKMYQVEFKT MNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEPDFYKT KIKLCILLHAFRIRAVTIDRVM SYLNAS			
Выступ: hFc(N297A)-[MPYDLYHP]-IL-12 (p40C252S), мутантный GAG-связывающий домен, KDNTEGRV	91	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGSGGSMPYDLYHPSGPIWE LKKDVYVV ELDWYPDAPGEMVVLTCDTP EEDGITWTLDQSSEVLGSGKT LTIQVKEFGD AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKN	AK667	DNA842

			YSGRFTCWWLTTISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSA ERVRGDNKEY EYSVECQEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNL QLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFSVQVQGKDN TEGRVFTDKTS ATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCSGGGGSGGG GSGGGGSRNLP VATPDPGMFPCLHHSQNLLRA VSNMLQKARQTLEFYPCTSEE IDHEDITKDK TSTVEACLPLELTKNESCLNSR ETSFITNGSCLASRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMNAKLLMDPKR QIFLDQNMLAVIDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIR AVTIDRVMSYLNAS		
	Выступ: hFc(N297A)-[MPYDLYHP]-IL-12 (p40C252S), мутантный GAG-связывающий домен,	92	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVM	AK668	DNA843

KDNTEG RV		HEALHNHYTQKSLSLSPGGGS GGSGGSMPYDLYHPSGPIWEL KKDVYVVE LDWYPDAPGEMVVLTCDTPE EDGITWTLDQSSEVLGSGKTL TIQVKEFGDA GQYTCHKGGEVLSHSLLLLHK KEDGIWSTDILKDQKEPKNKT FLRCEAKNY SGRFTCWWLTTISTDLTFSVKS SRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVDAVHKLKYENYTSSFFIRD IIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFSVQVQGKDNT EGRVFTDKTSA TVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCSGGGGSGGGGS GGGGSRNLP VATPDPGMFPCLHHSQNLLRA VSNMLQKARQTLEFYPCTSEE IDHEDITKDK TSTVEACLPLELTKNESCLNSR ETSFITNGSCLASRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMNAKLLMDPKR QIFLDQNMLAVIDELMQALNF NSETVPQKS SLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNAS

	Выступ: hFc(N297A)-[ISSGLLSGRS]-IL-12 (p40C252S), мутантный GAG-связывающий домен, KDNTEGRV	93	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSISSGLLSGRSSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKDNTEGRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE	AK669 AK922	DNA850

		EIDHEDITKD KTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMM ALCLSSIYEDLK MYQVEFKTMNAKLLMDPKR QIFLDQNMLAVIDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIR AVTIDRVMSYLNAS			
Выступ: hFc(N297A)-[ISSGLLSGRS]-IL-12 (p40C252S), мутантный GAG-связывающий домен, KDNTEGRV	94	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGSGGSGGSISSGLLSGRSSGPI WELKKDVYV VELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGK TLTIQVKEFG DAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKN KTFLRCEAK NYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLS AERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFI	AK670 AK923	DNA851

		RDIIKPDPPK NLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFSVQVQGK DNTEGRVFTD KTSATVICRKNASISVRAQDR YYSSSWSEWASVPCSGGGGS GGGGSGGGGS RNLPVATPDPGMFPCLHHSQN LLRAVSNMLQKARQTLEFYPC TSEEIDHED ITKDKTSTVEACLPLELTKNES CLNSRETSFITNGSCLASRKTS FMMALCLSSI YEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELM QALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCI LLHAFRIRAVTIDRVMSYLNA S			
	Выступ: hFc(N297A)-[DSGGFMLT]-IL-12 (p40C252S), мутантный GAG-связывающий домен, KDNTEGRV	95	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGSGGSDSGGFMLTSGPIW ELKKDVYV VELDWYPDAPGEMVVLTCDT	AK918	DNA844

		PEEDGITWTLDQSSEVLGSGK TLTIQVKEFGD AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNY SGRFTCWWLTTISTDLTFSVKS SRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVDAVHKLKYENYTSSFFIRD IIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFSVQVQGKDNT EGRVFTDKTSA TVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCSGGGGSGGGGS GGGGSRNLPV ATPDPGMFPCLHHSQNLLRAV SNMLQKARQTLEFYPCTSEEI DHEDITKDK TSTVEACLPLELTKNESCLNSR ETSFITNGSCLASRKTSFMMAL CLSSIYEDLKM YQVEFKTMNAKLLMDPKRQI FLDQNMLAVIDELMQALNFNS ETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIR AVTIDRVMSYLNAS		
Выступ: hFc(N297A)-[DSGGFMLT]-IL-12 (p40C252S),	96	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	AK919	DNA845

мутантный GAG-связывающий домен, KDNTEGRV		GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSGGSDSGGFMLTSGPI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQK EPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYE NYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFS VQVQGKDNTEGRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVP CSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQK ARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITN GSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD		

		QNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCIL LHAFRIRAV TIDRVMSYLNAS		
Выступ: hFc(N297A)-[RAAAVKSP]-IL-12 (p40C252S), мутантный GAG-связывающий домен, KDNTEGRV	97	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGGGSGGSRAAAVK SPSGPIWE LKKDVYVVELDWYPDAPGEM VVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGK TLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDI LKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCW WLTTISTDLTFSVKSSRGSSDP QGVTCGAA TLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAV HKLKYEN YTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTP HSYFSLTFS VQVQGKDNTEGRVFTDKTSA	AK920 AK924	DNA846

			TVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASV PCSGGGGSGGGGSGGGGSRN LPVATPDPGMFPCLHHSQNLL RAVSNMLQ KARQTLEFYPCTSEEIDHEDIT KDKTSTVEACLPLELTKNESC LNSRETSFI TNGSCLASRKTSFMMALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIF LDQNMLAVIDELMQALNFNS ETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLC ILLHAFRIR AVTIDRVMSYLNAS		
	Выступ: hFc(N297A)-[RAAAVKSP]-IL-12 (p40C252S), мутантный GAG-связывающий домен, KDNTEGRV	98	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGSGGSGGSRAAAVKSPS GPIWELKKD VYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSH SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQ	AK921 AK925	DNA847

			KEPKNKTFL RCEAKNYSGRFTCWWLTTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERV RGDNKEYEYSVECQEDSACPA AEESLPIEVMVDAVHKLKYEN YTSSFFIRD IIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFS VQVQGKDN TEGRVFTDKTSATVICRKNASI SVRAQDRYYSSSWSEWASVP CSGGGGSGG GGSGGGGSRNLPVATPDPGMF PCLHHSQNLLRAVSNMLQKA RQTLEFYPC TSEEIDHEDITKDKTSTVEACL PLELTKNESCLNSRETSFITNG SCLASRKTSF MMALCLSSIYEDLKMYQVEF KTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELM QALNFNSETVPQKSSLEEPDFY KTKIKLCILLHAFRIRAVTIDR VMSYLNAS		

11. ПЕРЕЧЕНЬ КОНСТРУКЦИЙ

В таблице ниже показаны полные последовательности для молекул, обозначенных справочным номером с «AK». Также показаны составные части последовательности, а также порядок, в котором они собраны в цепи молекул. Отдельные цепи обозначены справочным номером с «DNA».

Название молекулы	Новые названия	Последовательность Fc	Линкер	Последовательность компонента 3
) DNA406	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGS	VPLSLY
) DNA409	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-545)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS	CRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYE EGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRLQFSDQAC TVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDI GQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTPSSPWKLGDCC DTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSS PENPPQPQVRFSVEQLGQDGRRRLTLKEQPTQLELPE APGTEVTYRLQLHMLSCPCKAKATRTLHLGKMPYLSG. AVISSNQFGPGLNQTWHIPADTHTEPVALNISVGTNG WPARAQSMTYCIEWQPVGQDGGLATCSLTAPQDPD ATYSWSRESGAMGQEKCYYITIFASAHPEKLTLWSTVL GGNASAAGTPHHVSVKNHSLDSVSVDWAPSLLSTCP VVRCRDEDSKQVSEHPVQPTETQVTLSGLRAGVAYTV TAWLRGVWSQPQRFSIEVQVSD

1	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGSGGS	VPLSLY
1	DNA409	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-545)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS	CRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECSEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTPSSPWKLGDCGPDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSPVPENPPQPQVRFSVEQLGQDGRRRLTLKEQPTQLELPEGCAPGTEVTYRLQLHMLSCPCKAKATRTLHLGKMPYLSGAAAVISSNQFGPGLNQTWHIPADTHTEPVALNISVGTNGTTWPARAQSMTYCIEWQPVGQDGGLATCSLTAPQDPDPAATYSWSRESGAMGQEKCYYITIFASAHPEKLTLWSTVLSTGGNASAAGTPHHVSVKNHSLDSVSVDWAPSLLSTCPGVVVRCRDEDSKQVSEHPVQPTETQVTLSGLRAGVAYTVQTTAWLRGVWSQPQRFSIEVQVSD

3	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGSGGS	VPLSLY
3	DNA425	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-622)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSFLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSCGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSFYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPTGMIWYMKRHIDYSRQQISLFWKNLSVSEARGKILHYQVTLQEGKAMTQNITGHTSWTTVIPRTGNWAVAVSAANSKGSSNIMNLCEAGLLAPRQVSANSEGMDNILVTWQPPRKDPSEYVVEWRELHPGGDTQVPLNWLRSRPYNVSALISENIKSEIRVYALSGDQGGCSSILGNSKHKAPLSGPHINAITEEKGSWNSIPVQEQMGCLLHYRIYWKERDSNSQPQLCEIPYRVSHPINSLQPRVTYVLWMTALTAAGESSHGNEREFCLQGK

4	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGSGGS	VPLSLY
4	DNA410	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-237)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS	CRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECSEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTPSSPWKLGDCGPDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSPVPENP
5	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B--hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGSGGS	VPLSLY

5	DNA426	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSFLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSCGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSFYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE
4	DNA406	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGS	VPLSLY
4	DNA426	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSFLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSCGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSFYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE

5	DNA407	Выступ: hFc(N297A) -[VPLSLY]- hIL12B- hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGSGGS	VPLSLY
5	DNA539	Впадина: hFc(N297A)- IL12RB2(24-222)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSF LILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINS CGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT EYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN VTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIV
7	DNA407	Выступ: hFc(N297A)- [VPLSLY]- hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGSGGS	VPLSLY

7	DNA540	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGGSG	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSFLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSCGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSFYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE
8	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGSGGS	VPLSLY
9	DNA541	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGS	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSFLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSCGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSFYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE

8	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGSGGS	VPLSLY
8	DNA629	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-212)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSFLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSCGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNVTAVNSLGSSSSL
9	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGSGGS	VPLSLY

Э	DNA644	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-227)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSFLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSCGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPP

Название молекулы	Новые названия	Последовательность компонента 4	Субъединица p40 IL-12	Линкер	Субъединица p35 IL-12
) DNA406	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	GGGGSGGGGSGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
) DNA409	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-545)				

1	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	GGGGSGGGGSGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
1	DNA409	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-545)				
3	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	GGGGSGGGGSGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

3	DNA425	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2 (24-622)				
4	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	GGGGSGGGGSGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
4	DNA410	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-237)				

5	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	GGGGSGGGGSGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
5	DNA426	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)				
4	DNA406	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	GGGGSGGGGSGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

4	DNA426	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)				
5	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	GGGGSGGGGSGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
5	DNA539	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-222)				

7	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	GGGGSGGGGSGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
7	DNA540	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)				
8	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	GGGGSGGGGSGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

3	DNA541	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)				
3	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	GGGGSGGGGSGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
3	DNA629	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-212)				

9	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	GGGGSGGGGSGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
9	DNA644	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-227)				

Название молекулы	Новые названия	Высвобождается посредством расщепления
0 DNA406	Выступ: hFc(N297A)-[VPLS LY]-hIL12B-hIL12A	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
0 DNA409	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-545)	
1 DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

1	DNA409	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-545)	
3	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
3	DNA425	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-622)	

4	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
4	DNA410	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-237)	
5	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

5	DNA426	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	
4	DNA406	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
4	DNA426	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	
5	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

6	DNA539	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-222)	
7	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
7	DNA540	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	
8	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

3	DNA541	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	
3	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
3	DNA629	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-212)	
9	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSW SEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

Э	DNA644	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-227)

Название молекулы	Новые названия	Полная последовательность
) DNA406	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSV PLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHK GGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQ VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSG GGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEAC LPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVID ELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

0	DNA409	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-545)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSG GGGSCRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECSWQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRL QFSDQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFR HRTPSSPWKLGDCGPQDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSPVCVPPENPPQPQVRFSVEQL GQDGRRRLTLKEQPTQLELPEGCQGLAPGTEVTYRLQLHMLSCPCKAKATRTLHLGKMPYLSGAAYNVAVISSNQFG PGLNQTWHIPADTHTEPVALNISVGTNGTTMYWPARAQSMTYCIEWQPVGQDGGLATCSLTAPQDPDPAGMATY SWSRESGAMGQEKCYYITIFASAHPEKLTLWSTVLSTYHFGGNASAAGTPHHVSVKNHSLDSVSVDWAPSLLSTCPG VLKEYVVRCRDEDSKQVSEHPVQPTETQVTLSGLRAGVAYTVQVRADTAWLRGVWSQPQRFSIEVQVSD
1	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSG GSVPLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASV PCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTST VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

1	DNA409	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-545)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSG GGGSCRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECSWQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRL QFSDQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFR HRTPSSPWKLGDCGPQDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSPVCVPPENPPQPQVRFSVEQL GQDGRRRLTLKEQPTQLELPEGCQGLAPGTEVTYRLQLHMLSCPCKAKATRTLHLGKMPYLSGAAYNVAVISSNQFG PGLNQTWHIPADTHTEPVALNISVGTNGTTMYWPARAQSMTYCIEWQPVGQDGGLATCSLTAPQDPDPAGMATY SWSRESGAMGQEKCYYITIFASAHPEKLTLWSTVLSTYHFGGNASAAGTPHHVSVKNHSLDSVSVDWAPSLLSTCPG VLKEYVVRCRDEDSKQVSEHPVQPTETQVTLSGLRAGVAYTVQVRADTAWLRGVWSQPQRFSIEVQVSD

3	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSG GSVPLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASV PCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTST VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

3	DNA425	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-622)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSG GGGSKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLF VCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIY CDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLRY RPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPTGMLDVWYMKRHID YSRQQISLFWKNLSVSEARGKILHYQVTLQELTGGKAMTQNITGHTSWTTVIPRTGNWAVAVSAANSKGSSLPTRINI MNLCEAGLLAPRQVSANSEGMDNILVTWQPPRKDPSAVQEYVVEWRELHPGGDTQVPLNWLRSRPYNVSALISENI KSYICYEIRVYALSGDQGGCSSILGNSKHKAPLSGPHINAITEEKGSILISWNSIPVQEQMGCLLHYRIYWKERDSNSQP QLCEIPYRVSQNSHPINSLQPRVTYVLWMTALTAAGESSHGNEREFCLQGKAN

4	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSG GSVPLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASV PCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTST VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
4	DNA410	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-237)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSG GGGSCRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECSWQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRL QFSDQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFR HRTPSSPWKLGDCGPQDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSPVCVPPENP

DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSG GSVPLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASV PCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTST VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
DNA426	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSG GGGSKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLF VCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIY CDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLRY RPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE

4	DNA406	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSV PLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHK GGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQ VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSG GGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEAC LPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVID ELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
4	DNA426	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSG GGGSKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLF VCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIY CDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLRY RPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE

5	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSG GSVPLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASV PCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTST VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
5	DNA539	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-222)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSG GGGSKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLF VCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIY CDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIV

7	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSG GSVPLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASV PCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTST VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
7	DNA540	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGG SGKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCK LACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDY LDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPS NSRLWNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE

3	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSG GSVPLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASV PCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTST VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
3	DNA541	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSKI DACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACI NSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFG INLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRL WNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE

3	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSG GSVPLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASV PCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTST VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
3	DNA629	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-212)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSG GGGSKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLF VCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIY CDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSL

9	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSG GSVPLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASV PCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTST VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
9	DNA644	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-227)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSG GGGSKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLF VCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIY CDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPP

ne	Новые названия	Последовательность компонента 1	Последовательность компонента 2
.58	Впадина: hFc(N297A)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	
.06	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGS

07	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT GGSGGSGGS KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
09	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-545)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGS KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-237)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGS KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-622)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGS KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

26	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS
39	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-222)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS
40	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGSGGGSG

41	Впадина: hFc(N297A) - IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGS
29	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-212)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS
44	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-222)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS

527	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-210)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS
528	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-211)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS
529	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-212)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS

30	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-213)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGSKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-214)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGSKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-215)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGSKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

33	Впадина: hFc(N297A) - IL12RB2(24-216)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGS KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
34	Впадина: hFc(N297A) - IL12RB2(24-217)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGS KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
35	Впадина: hFc(N297A) - IL12RB2(24-218)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGS KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

36	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-219)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGSKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
37	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-220)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGSKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-221)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGSKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

39	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-222)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGSKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
40	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-223)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGSKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
41	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-224)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT GGGGSGGGGSKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

342	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-225)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS
343	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-226)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS
344	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-227)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS

45	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-228)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS
46	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-229)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS
47	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-230)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS

48	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-231)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS
49	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-232)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS
50	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-233)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	GGGGSGGGGS

ne	Новые названия	Последовательность компонента 3	Последовательность компонента 4	Субъединица p40 IL-12
.58	Впадина: hFc(N297A)			
.06	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY] - hIL12B-hIL12A	VPLSLY	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVL SHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYS GRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATL SAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVD AVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFT DKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
.07	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	VPLSLY	SGP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVL SHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYS GRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATL SAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVD AVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFT DKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

09	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-545)	CRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECSWQ YEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVSV LYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVS KLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTPSSPWKLGDCGP QDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSP VCVPPENPPQPQVRFSVEQLGQDGRRRLTLKEQPTQLELPE GCQGLAPGTEVTYRLQLHMLSCPCKAKATRTLHLGKMPYLS GAAYNVAVISSNQFGPGLNQTWHIPADTHTEPVALNISVGT NGTTMYWPARAQSMTYCIEWQPVGQDGGLATCSLTAPQD PDPAGMATYSWSRESGAMGQEKCYYITIFASAHPEKLTLWS TVLSTYHFGGNASAAGTPHHVSVKNHSLDSVSVDWAPSLLS TCPGVLKEYVVRCRDEDSKQVSEHPVQPTETQVTLSGLRAGV AYTVQVRADTAWLRGVWSQPQRFSIEVQVSD
10	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-237)	CRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECSWQ YEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVSV LYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVS KLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTPSSPWKLGDCGP QDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSP VCVPPENP

25	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-622)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKAS VSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGR HDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEP TGMLDVWYMKRHIDYSRQQISLFWKNLSVSEARGKILHYQV TLQELTGGKAMTQNITGHTSWTTVIPRTGNWAVAVSAANS KGSSLPTRINIMNLCEAGLLAPRQVSANSEGMDNILVTWQP PRKDPSAVQEYVVEWRELHPGGDTQVPLNWLRSRPYNVSA LISENIKSYICYEIRVYALSGDQGGCSSILGNSKHKAPLSGPHIN AITEEKGSILISWNSIPVQEQMGCLLHYRIYWKERDSNSQPQL CEIPYRVSQNSHPINSLQPRVTYVLWMTALTAAGESSHGNE REFCLQGKAN
26	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKAS VSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGR HDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE

39	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-222)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIV
40	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKAS VSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGR HDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE
41	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKAS VSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGR HDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE

529	Впадина: hFc(N297A) - IL12RB2(24-212)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSL
544	Впадина: hFc(N297A) - IL12RB2(24-222)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIV
527	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-210)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSS

28	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-211)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSS
29	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-212)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSL
30	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-213)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLP

31	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-214)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPS
32	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-215)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPST
33	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-216)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTF

34	Впадина: hFc(N297A) - IL12RB2(24-217)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFT
35	Впадина: hFc(N297A) - IL12RB2(24-218)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTF
36	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-219)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFL
37	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-220)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLD

38	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-221)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDI
39	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-222)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIV
40	Впадина: hFc(N297A) IL12RB2(24-223)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVR

41	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-224)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRP
42	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-225)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPL
43	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-226)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLP

44	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-227)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPP
45	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-228)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPW
46	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-229)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWD

47	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-230)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDI
48	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-231)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIR
49	Впадина: hFc(N297A) IL12RB2(24-232)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRI
50	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-233)	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDE IQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDT HLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPES NFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIK

ne	Новые названия	Линкер	Субъединица p35 IL-12	Высвобождается посредством расщепления
06	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	GGGGSGGGGSGGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

07	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	GGGGSGGGGSGGGGGS	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	LYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

ne	Новые названия	Линкер	Полная последовательность
.58	Впадина: hFc(N297A)		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
.06	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	GGGGSGGG GSGGGGS	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSVPLSLYSGPI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNK EYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPV ATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSC LASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKT KIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

07	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A	GGGGSGGGGSGGGGGS	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGSGGSVPLSLYSGPIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
09	Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-545)		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSCRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECSWQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTPSSPWKLGDCGPQDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSPVCVPPENPPQPQVRFSVEQLGQDGRRRLTLKEQPTQLELPEGCQGLAPGTEVTYRLQLHMLSCPCKAKATRTLHLGKMPYLSGAAYNVAVISSNQFGPGLNQTWHIPADTHTEPVALNISVGTNGTTMYWPARAQSMTYCIEWQPVGQDGGLATCSLTAPQDPDPAGMATYSWSRESGAMGQEKCYYITIFASAHPEKLTLWSTVLSTYHFGGNASAAGTPHHVSVKNHSLDSVSVDWAPSLLSTCPGVLKEYVVRCRDEDSKQVSEHPVQPTETQVTLSGLRAGVAYTVQVRADTAWLRGVWSQPQRFSIEVQVSD

Впадина: hFc(N297A)-hCD212(24-237)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSCRTSEC CFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECSWQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVSVLYT VTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTPSSPWKLGDCGP QDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSPVCVPPENP
Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-622)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKG RHDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPTGMLDVWYMKRHIDYSRQQISLFWKNLSVSEARGKILH YQVTLQELTGGKAMTQNITGHTSWTTVIPRTGNWAVAVSAANSKGSSLPTRINIMNLCEAGLLAPRQVSANSEGMDNIL VTWQPPRKDPSAVQEYVVEWRELHPGGDTQVPLNWLRSRPYNVSALISENIKSYICYEIRVYALSGDQGGCSSILGNSKHK APLSGPHINAITEEKGSILISWNSIPVQEQMGCLLHYRIYWKERDSNSQPQLCEIPYRVSQNSHPINSLQPRVTYVLWMTAL TAAGESSHGNEREFCLQGKAN

26	**Впадина:** hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKG RHDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE
39	**Впадина: hFc(N297A)-**IL12RB2(24-222)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIV
40	**Впадина:** hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGGSGKIDACKRG DVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGA EIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTA KVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHD LLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE

41	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-319)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSKIDACKRGDVT VKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFV GVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVT AVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLLD LKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEE
29	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-212)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSL
44	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-222)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPP

527	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-210)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSS
528	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-211)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSS
529	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-212)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSL

30	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-213)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLP
31	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-214)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPS
32	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-215)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPST

33	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-216)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTF
34	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-217)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFT
35	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-218)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTF

36 **Впадина:** hFc(N297A)-IL12RB2(24-219)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK
RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC
GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN
FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFL

37 **Впадина:** hFc(N297A)-IL12RB2(24-220)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK
RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC
GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN
FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLD

38 **Впадина:** hFc(N297A)-IL12RB2(24-221)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK
RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC
GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN
FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDI

39	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-222)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIV
40	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-223)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVR
41	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-224)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRP

342	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-225)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPL
343	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-226)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLP
344	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-227)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPP

45	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-228)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPW
46	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-229)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWD
47	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-230)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDI

48	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-231)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIR
49	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-232)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRI
50	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-233)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSKIDACK RGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQIC GAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIK

ecule	Уникальные последовательности		Партнер по коэкспрессии	
	ДНК	Название	ДНК	Название
	DNA627	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-210)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA628	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-211)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA630	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-213)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA631	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-214)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA632	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-215)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA633	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-216)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA634	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-217)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA635	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24--218)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA636	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-219)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA637	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-220)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA638	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-221)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA639	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-222)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA640	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-223)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
	DNA641	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-224)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A

DNA642	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-225)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
DNA643	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-226)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
DNA645	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-228)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
DNA646	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-229)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
DNA647	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-230)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
DNA648	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-231)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
DNA649	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-232)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A
DNA650	Впадина: hFc(N297A)-IL12RB2(24-233)	DNA407	Выступ: hFc(N297A)-[VPLSLY]-hIL12B-hIL12A

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Маскированный цитокин IL-12, который содержит гетеродимер белка, содержащий:

первую полипептидную цепь, содержащую

N' **HL1-L1-MM** C',

и вторую полипептидную цепь, содержащую

N' **HL2-L2-C** C',

где HL1 представляет собой первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, L1 представляет собой первый линкер, MM представляет собой маскирующий компонент, HL2 представляет собой второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, L2 представляет собой второй линкер, и C представляет собой цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент,

где первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, ассоциирован со вторым доменом, обеспечивающим увеличение периода полужизни, и

где один из первого линкера или второго линкера содержит протеолитически расщепляемый пептид.

2. Маскированный цитокин по п. 1, где полипептид IL-12 или его функциональный фрагмент содержат полипептид IL-12p40 или его функциональный фрагмент, ковалентно связанные с полипептидом IL-12p35 или его функциональным фрагментом.

3. Маскированный цитокин по п. 2, где длина линкера IL-12p40 - IL-12p35 составляет 5-20 аминокислот.

4. Маскированный цитокин по п. 2 или п. 3, где линкер IL-12p40 - IL-12p35 характеризуется высоким содержанием аминокислотных остатков G и S.

5. Маскированный цитокин по любому из пп. 2-4, где линкер IL-12p40 - IL-12p35 содержит SEQ ID NO: 3 (GGGGSGGGGSGGGGS).

6. Маскированный цитокин по любому из пп. 2-5, где полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1.

7. Маскированный цитокин по п. 6, где полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 1.

8. Маскированный цитокин по п. 6, где полипептид IL-12p40 предусматривает по меньшей мере одну аминокислотную модификацию GAG-связывающего домена (KSKREKKDRV) по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1.

9. Маскированный цитокин по п. 8, где полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 57.

10. Маскированный цитокин по п. 8, где полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 58.

11. Маскированный цитокин по любому из пп. 6-10, где полипептид IL-12p40

содержит аминокислотную последовательность, предусматривающую одну или более мутаций с заменой цистеина по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1.

12. Маскированный цитокин по п. 11, где полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 59.

13. Маскированный цитокин по п. 11, где полипептид IL-12p40 содержит SEQ ID NO: 60.

14. Маскированный цитокин по любому из пп. 2-13, где полипептид IL-12p35 содержит SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, предусматривающую по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2.

15. Маскированный цитокин по п. 14, где полипептид IL-12p35 содержит SEQ ID NO: 2.

16. Маскированный цитокин по любому из пп. 1-7, где цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат SEQ ID NO: 4.

17. Маскированный цитокин по любому из пп. 1-10, где цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат SEQ ID NO: 61.

18. Маскированный цитокин по любому из пп. 1-10, где цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат SEQ ID NO: 62.

19. Маскированный цитокин по любому из пп. 1-12, где цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат SEQ ID NO: 63.

20. Маскированный цитокин по любому из пп. 1-13, где цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент содержат SEQ ID NO: 64.

21. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где маскирующий компонент содержит рецептор цитокина IL-12 или его субъединицу или функциональный фрагмент.

22. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где маскирующий компонент содержит внеклеточный домен IL-12Rβ1 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12.

23. Маскированный цитокин по п. 22, где маскирующий компонент содержит остатки 24-237 IL-12Rβ1 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 5.

24. Маскированный цитокин по п. 22, где маскирующий компонент содержит остатки 24-545 IL-12Rβ1 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 6.

25. Маскированный цитокин по любому из пп. 1-21, где маскирующий компонент содержит внеклеточный домен IL-12Rβ2 человека или его фрагмент, часть или вариант, которые сохраняют или иным образом демонстрируют аффинность в отношении IL-12.

26. Маскированный цитокин по п. 25, где маскирующий компонент содержит остатки 24-212 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 7.

27. Маскированный цитокин по п. 25, где маскирующий компонент содержит

остатки 24-222 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 8, или где маскирующий компонент содержит остатки 24-227 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 11.

28. Маскированный цитокин по п. 25, где маскирующий компонент содержит остатки 24-319 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 9.

29. Маскированный цитокин по п. 28, где маскирующий компонент содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 9, где необязательно указанные модификации представляют собой мутации с заменой цистеина.

30. Маскированный цитокин по п. 29, где маскирующий компонент содержит SEQ ID NO: 65.

31. Маскированный цитокин по п. 25, где маскирующий компонент содержит остатки 24-622 IL-12Rβ2 человека, а именно последовательность под SEQ ID NO: 10.

32. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где длина расщепляемого пептида составляет 6-10 аминокислот.

33. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15.

34. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41.

35. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42.

36. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43.

37. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44.

38. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где расщепляемый пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45.

39. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где первая полипептидная цепь содержит

N’ **HL1-нерасщепляемый L1-MM** C’,

и вторая полипептидная цепь содержит

N’ **HL2-расщепляемый L2-C** C’.

40. Маскированный цитокин по п. 39, где длина нерасщепляемого линкера составляет 3-18 аминокислот.

41. Маскированный цитокин по п. 39, где длина нерасщепляемого линкера составляет 3-15 аминокислот.

42. Маскированный цитокин по любому из пп. 30-41, где нерасщепляемый линкер характеризуется высоким содержанием аминокислотных остатков G и S.

43. Маскированный цитокин по любому из пп. 39-42, где нерасщепляемый линкер содержит $[(G)_nS]$, где n равняется 4 или 5.

44. Маскированный цитокин по любому из пп. 39-43, где нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12 (GGGGS).

45. Маскированный цитокин по любому из пп. 39-43, где нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13 (GGGGSGGGGS).

46. Маскированный цитокин по любому из пп. 39-43, где нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 14 (GGSGGGSGGGGGS).

47. Маскированный цитокин по любому из пп. 39-42, где нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 54 (GGSGGSGGSGGSGGSSGP).

48. Маскированный цитокин по любому из пп. 39-42, где нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 55 (PGGSGP).

49. Маскированный цитокин по любому из пп. 39-42, где нерасщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 56 (GGSPG).

50. Маскированный цитокин по любому из пп. 39-49, где расщепляемый линкер содержит протеолитически расщепляемый пептид (CP), фланкированный с обеих сторон спейсерным доменом (SD):

SD1-CP-SD2,

где SD1 и SD2 являются различными таким образом, что первая полипептидная цепь содержит

N' **HL1-нерасщепляемый L1-MM** C',

и вторая полипептидная цепь содержит

N' **HL2-SD1-CP-SD2 -C** C'.

51. Маскированный цитокин по п. 50, где длина первого спейсерного домена (SD1) составляет 3-10 аминокислот.

52. Маскированный цитокин по п. 50 или п. 51, где SD1 содержит SEQ ID NO: 16 (GGSGGS).

53. Маскированный цитокин по п. 50 или п. 51, где SD1 содержит SEQ ID NO: 17 (GGSGGSGGS).

54. Маскированный цитокин по любому из пп. 50-53, где длина второго спейсерного домена (SD2) составляет 3-6 аминокислот.

55. Маскированный цитокин по любому из пп. 50-54, где SD2 содержит SEQ ID NO: 18 (SGP).

56. Маскированный цитокин IL-2 по п. 50, где протеолитически расщепляемый линкер содержит SD1-CP-SD2, где SD1 представляет собой первый спейсерный домен, CP представляет собой расщепляемый пептид, и SD2 представляет собой второй спейсерный

домен, и где CP характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 44, и SD2 характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 18.

57. Маскированный цитокин IL-2 по п. 50, где протеолитически расщепляемый линкер содержит SD1-CP-SD2, где SD1 представляет собой первый спейсерный домен, CP представляет собой расщепляемый пептид, и SD2 представляет собой второй спейсерный домен, и где CP характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 45, и SD2 характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 18.

58. Маскированный цитокин по любому из пп. 50-54, где расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 19 (GGSGGS**VPLSLY**SGP).

59. Маскированный цитокин по любому из пп. 50-54, где расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 20 (GGSGGSGGS**VPLSLY**SGP).

60. Маскированный цитокин по п. 50, где расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 46 (GGSGGSMPYDLYHPSGP).

61. Маскированный цитокин по п. 50, где расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 47 (GGSGGSGGSMPYDLYHPSGP).

62. Маскированный цитокин по п. 50, где расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 48 (GGSGGSDSGGFMLTSGP).

63. Маскированный цитокин по п. 50, где расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 49 (GGSGGSGGSDSGGFMLTSGP).

64. Маскированный цитокин по п. 50, где расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 50 (GGSGGSRAAAVKSPSGP).

65. Маскированный цитокин по п. 50, где расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 51 (GGSGGSGGSRAAAVKSPSGP).

66. Маскированный цитокин по п. 50, где расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 52 (GGSGGSISSGLLSGRSSGP).

67. Маскированный цитокин по п. 50, где расщепляемый линкер содержит SEQ ID NO: 53 (GGSGGSGGSISSGLLSGRSSGP).

68. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит первый Fc-домен IgG1 или его фрагмент, и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит второй Fc-домен IgG1 или его фрагмент.

69. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где каждый из первого и/или второго Fc-доменов предусматривает наличие одной или более модификаций, которые способствуют нековалентной ассоциации первого и второго доменов, обеспечивающих увеличение периода полужизни.

70. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 25 (Y349C; T366S; L38A; Y407V и N297A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни,

содержит SEQ ID NO: 26 (S354C, T366W и N297A).

71. Маскированный цитокин по любому из предыдущих пунктов, где первый домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 27 (Y349C; T366S; L38A; Y407V, N297A и I253A), и второй домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, содержит SEQ ID NO: 28 (S354C, T366W, N297A и I253A).

72. Маскированный цитокин по п. 1, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40.

73. Продукт расщепления, способный связываться с IL-12R, при этом продукт расщепления содержит цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, получаемые посредством протеолитического расщепления расщепляемого пептида в маскированном цитокине IL-12 по любому из пп. 1-42.

74. Продукт расщепления маскированного цитокина IL-12, где продукт расщепления способен связываться с IL-12R, при этом продукт расщепления содержит полипептид, содержащий:

PCP-SD2-C,

где PCP представляет собой часть протеолитически расщепляемого пептида; SD2 представляет собой спейсерный домен, и C представляет собой цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент.

75. Продукт расщепления по п. 74, где PCP представляет собой часть протеолитически расщепляемого пептида, определенного в любом из пп. 32-38.

76. Продукт расщепления по п. 74 или п. 75, где SD2 представляет собой спейсерный домен, определенный в любом из пп. 54-55.

77. Продукт расщепления по любому из пп. 74-76, где C представляет собой цитокин IL-12 или его функциональный фрагмент, определенные в любом из пп. 2-20.

78. Продукт расщепления по любому из пп. 74-77, где продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся приблизительно или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29.

79. Продукт расщепления по п. 78, где продукт расщепления содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29.

80. Нуклеиновая кислота, кодирующая маскированный цитокин IL-12 по любому из пп. 1-72 или кодирующая одну из полипептидных цепей маскированного цитокина IL-12 по любому из пп. 1-72.

81. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 80.

82. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую маскированный цитокин IL-12 по любому из пп. 1-72.

83. Композиция, содержащая маскированный цитокин IL-12 по любому из пп. 1-72.

84. Фармацевтическая композиция, содержащая маскированный цитокин IL-12 по

любому из пп. 1-72 и фармацевтически приемлемый носитель.

85. Фармацевтическая композиция по п. 84, где фармацевтическая композиция представлена в виде единичной дозированной лекарственной формы.

86. Фармацевтическая композиция по п. 84, где фармацевтическая композиция составлена для внутривенного введения и представлена в виде единичной дозированной лекарственной формы.

87. Фармацевтическая композиция по п. 84, где фармацевтическая композиция составлена для инъекции и представлена в виде единичной дозированной лекарственной формы.

88. Фармацевтическая композиция по п. 84, где фармацевтическая композиция представляет собой жидкость и представлена в виде единичной дозированной лекарственной формы.

89. Набор, содержащий маскированный цитокин IL-12 по любому из пп. 1-41, или композицию по п. 83, или фармацевтическую композицию по пп. 84-88.

90. Способ получения маскированного цитокина IL-12 по любому из пп. 1-72, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 82 в условиях, обеспечивающих получение маскированного цитокина IL-12.

91. Нуклеиновая кислота, кодирующая продукт расщепления по любому из пп. 73-79.

92. Композиция, содержащая продукт расщепления по любому из пп. 73-79.

93. Фармацевтическая композиция, содержащая продукт расщепления по любому из пп. 73-79 и фармацевтически приемлемый носитель.

94. Маскированный цитокин IL-12 по любому из пп. 1-72 для применения в медицине.

95. Продукт расщепления по любому из пп. 73-79 для применения в медицине.

96. Способ лечения или предупреждения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества маскированного цитокина IL-12 по любому из пп. 1-72.

97. Способ лечения или предупреждения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества композиции по п. 83 или п. 92.

98. Способ лечения или предупреждения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 84-88 и п. 93.

99. Способ лечения или предупреждения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества маскированного цитокина IL-12 по любому из пп. 1-72, где маскированный цитокин протеолитически расщепляется *in vivo* с получением продукта расщепления по любому из пп. 73-79.

100. Способ лечения или предупреждения рака у субъекта, при этом способ включает стадию получения продукта расщепления *in vivo*, который способен связываться с его когнатным рецептором, где продукт расщепления является таким, как определено в

любом из пп. 73-79.

101. Способ по любому из пп. 96-100, где рак представляет собой солидную опухоль.

102. Маскированный цитокин IL-12 по любому из пп. 1-72 для применения в лечении или предупреждении рака.

103. Маскированный цитокин IL-12 по любому из пп. 1-72 для применения в способе лечения или предупреждения рака, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества маскированного цитокина IL-12, где маскированный цитокин протеолитически расщепляется *in vivo* с получением продукта расщепления по любому из пп. 73-79.

104. Маскированный цитокин IL-12 для применения по п. 103, где рак представляет собой солидную опухоль.

105. Продукт расщепления по любому из пп. 73-79 для применения в лечении или предупреждении рака.

106. Продукт расщепления по любому из пп. 73-79 для применения в способе лечения или предупреждения рака, при этом способ включает стадию введения маскированного цитокина по любому из пп. 1-72 пациенту с обеспечением таким образом получения продукта расщепления посредством протеолитического расщепления маскированного цитокина *in vivo.*

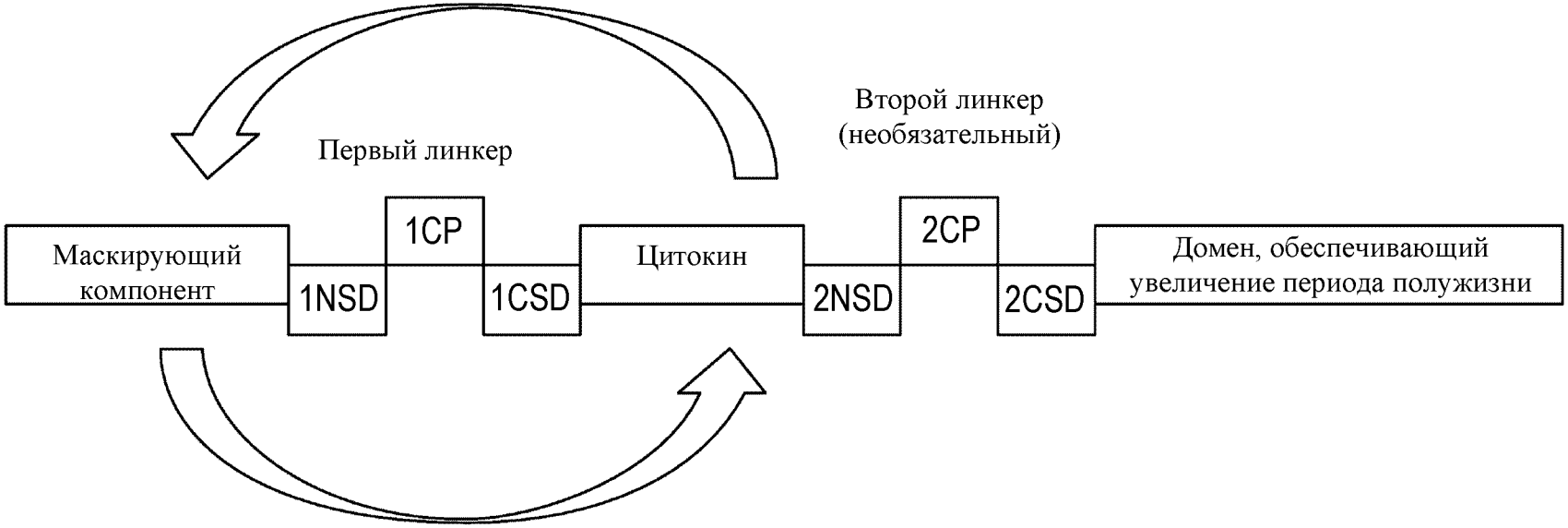
107. Продукт расщепления по любому из пп. 73-79 для применения в способе лечения или предупреждения рака у субъекта, при этом способ включает стадию получения продукта расщепления посредством протеолитического расщепления *in vivo* из маскированного цитокина по любому из пп. 1-72, который был введен субъекту.

108. Продукт расщепления для применения по любому из пп. 105-107, где рак представляет собой солидную опухоль.

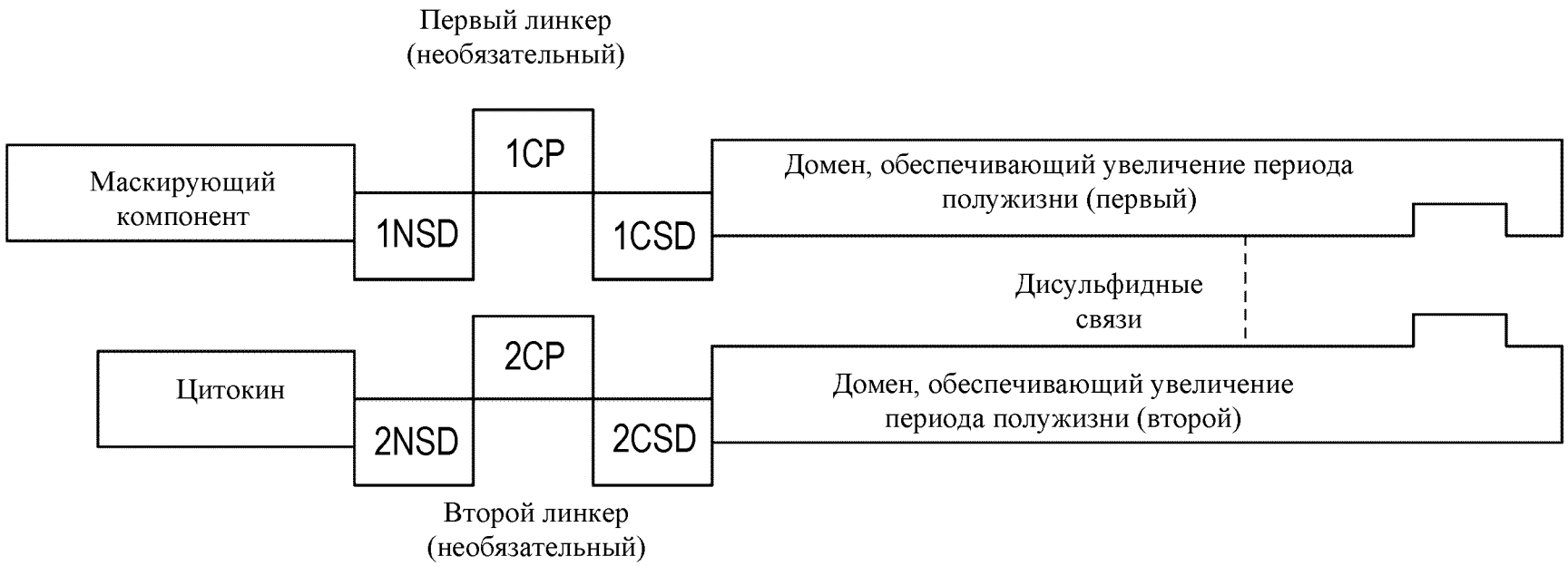
109. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 84-88 и п. 93 для применения в лечении или предупреждении рака.

110. Фармацевтическая композиция для применения по п. 109, где рак представляет собой солидную опухоль.

По доверенности


Второй линкер
(необязательный)
Первый линкер
Маскирующий компонент
1NSD
1CP
1CSD
Цитокин
2NSD
2CP
2CSD
Домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни

ФИГ. 1


Первый линкер
(необязательный)
Маскирующий компонент
1NSD
1CP
1CSD
Домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни (первый)
Дисульфидные связи
Цитокин
2NSD
2CP
2CSD
Домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни (второй)
Второй линкер
(необязательный)

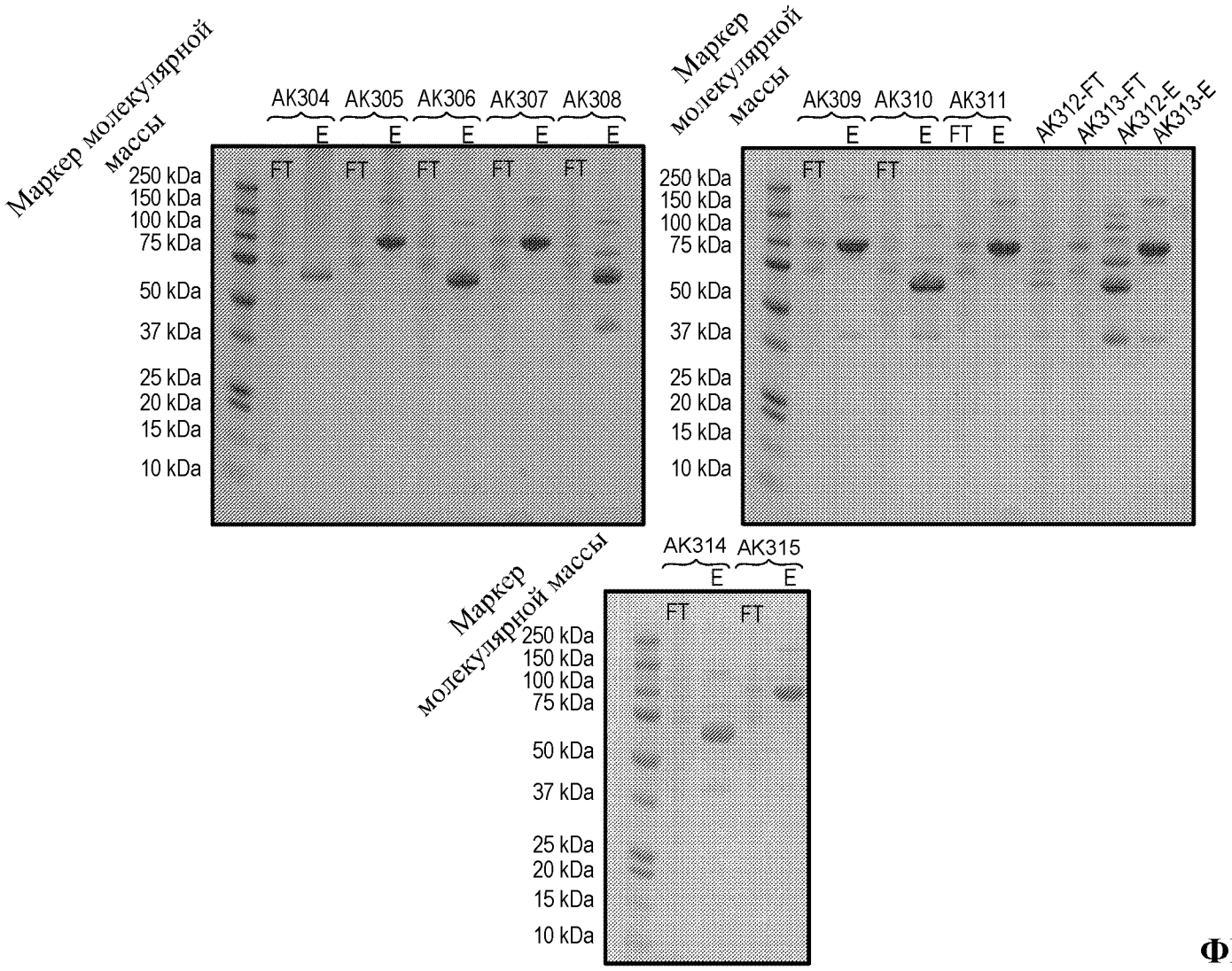
ФИГ. 2

ФИГ. 3А

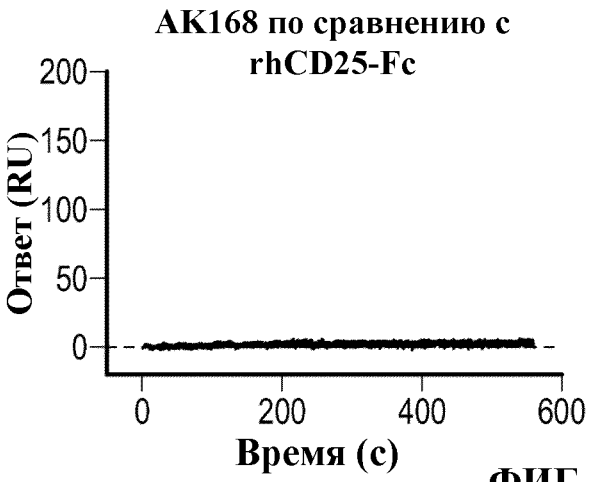

β
Микроокружение опухоли
Расщепление протеазой в опухоли
β
N-конец
N-конец

ФИГ. 3В

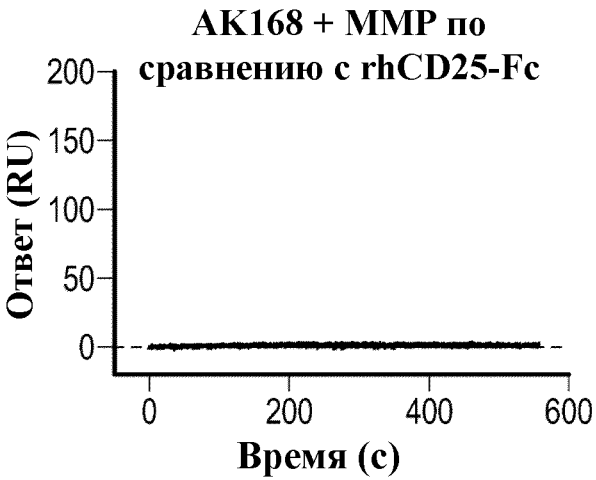

β
Микроокружение опухоли
Расщепление протеазой в опухоли
β
N-конец
N-конец


Маркер молекулярной массы
AK304
AK305
AK306
AK307
AK308
E
FT
250 kDa
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa
Маркер молекулярной массы
AK309
AK310
AK311
AK312-FT
AK313-FT
AK312-E
AK313-E
Маркер молекулярной массы
AK314
AK315

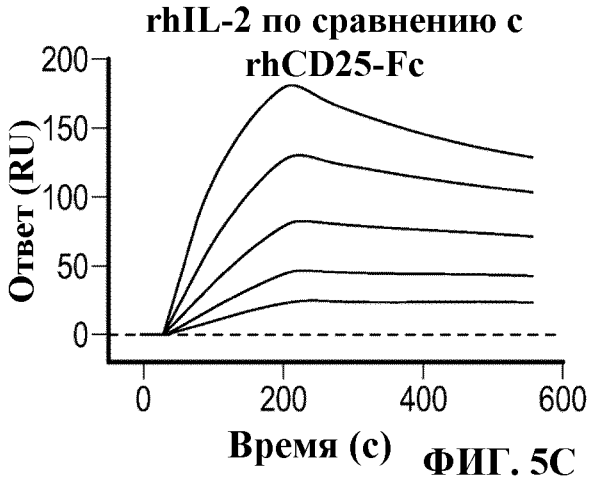
ФИГ. 4



ФИГ. 5A



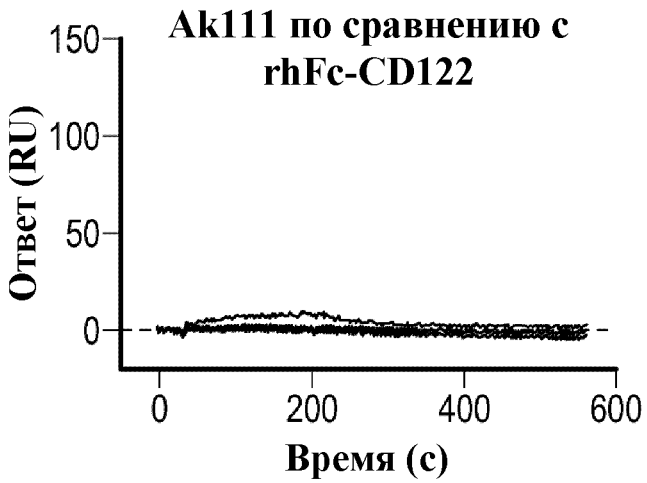
ФИГ. 5B



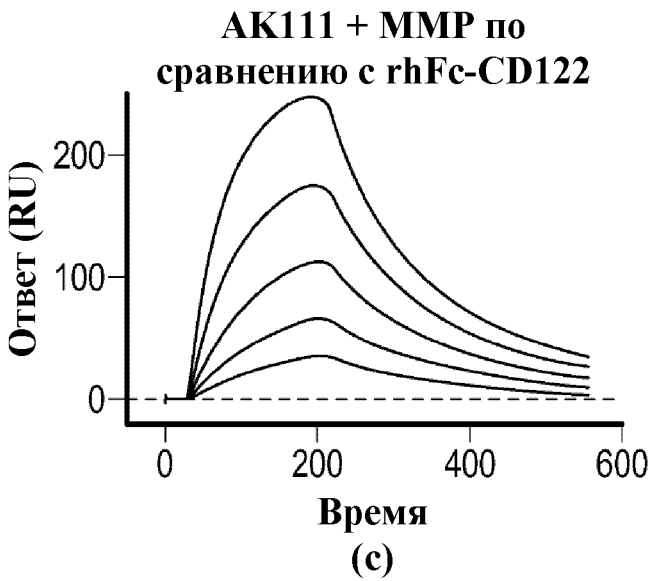
ФИГ. 5C

Образец	ka (1/(M*c))	kd (1/c)	KD	Chi2	U-значение: kd (%)
AK168	ND	ND	ND	ND	ND
AK168+ MMP	ND	ND	ND	ND	ND
rhIL-2	8,30e+5	7,29e-4	0,878 нМ	7,01	3,1

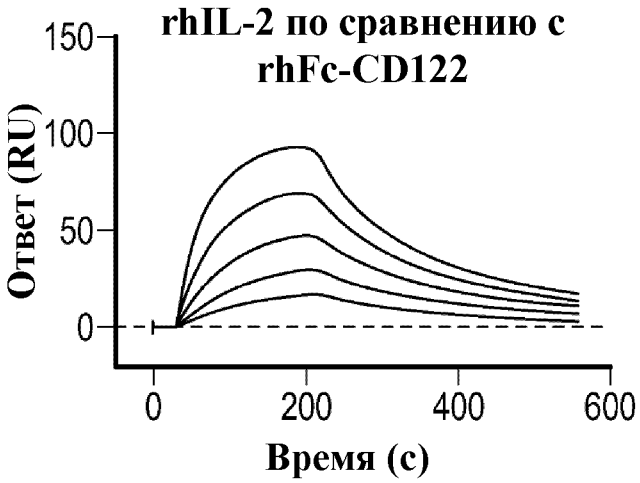
ФИГ. 5D



ФИГ. 6A



ФИГ. 6B



ФИГ. 6C

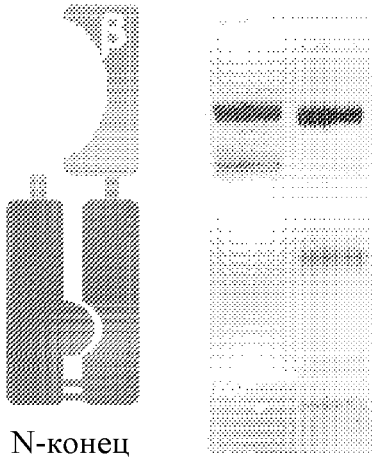
Образец	ka (1/(M*s))	kd (1/s)	KD	Chi2	U-значение: kd (%)
AK111	ND	ND	ND	ND	ND
AK111+ MMP	2,64e+4	6,21e-3	235 нМ	9,82	0,6
rhIL-2	4,17e+4	5,17e-3	124 нМ	2,09	0,8

ФИГ. 6D

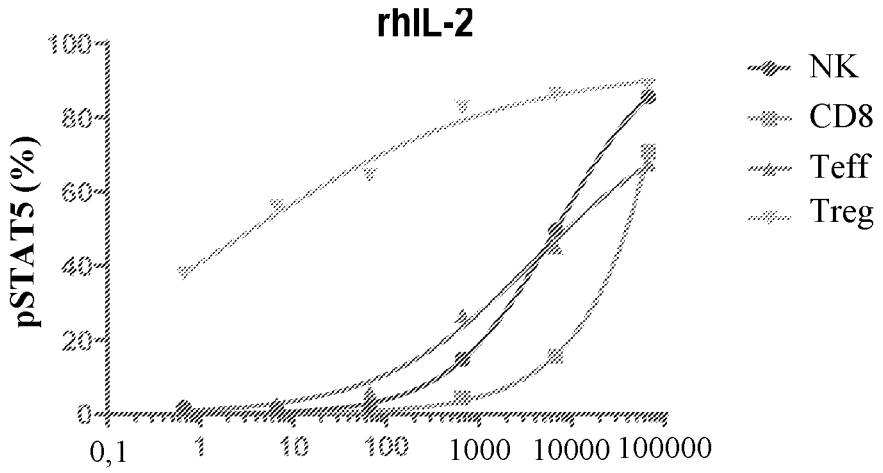
ФИГ. 7A


Микроокружение опухоли
Расщепление протеазой в опухоли
MMPs
N-конец

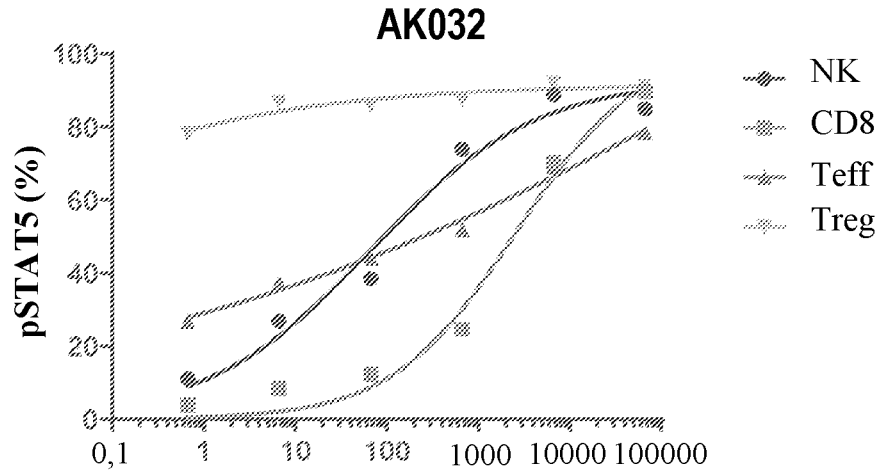
ФИГ. 7B


MMP10
Fc-CD122
Fc-IL2
Fc
IL2
N-конец

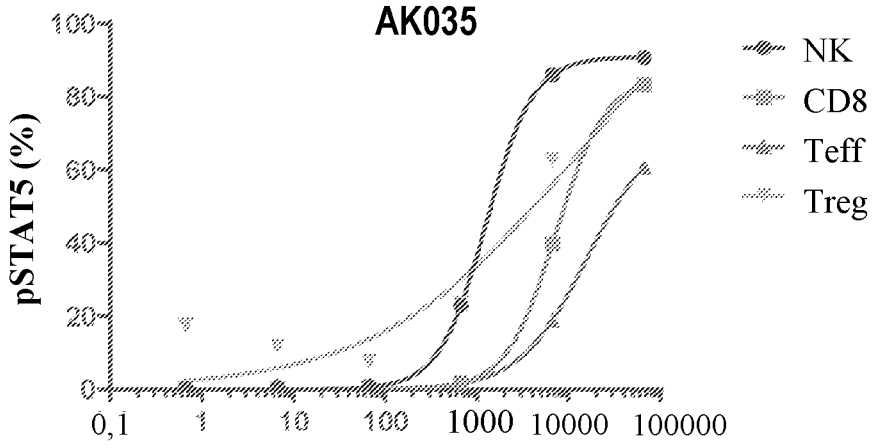
ФИГ. 8A


rhIL-2
pSTAT5 (%)
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
1000
10000
100000
NK
CD8
Teff
Treg

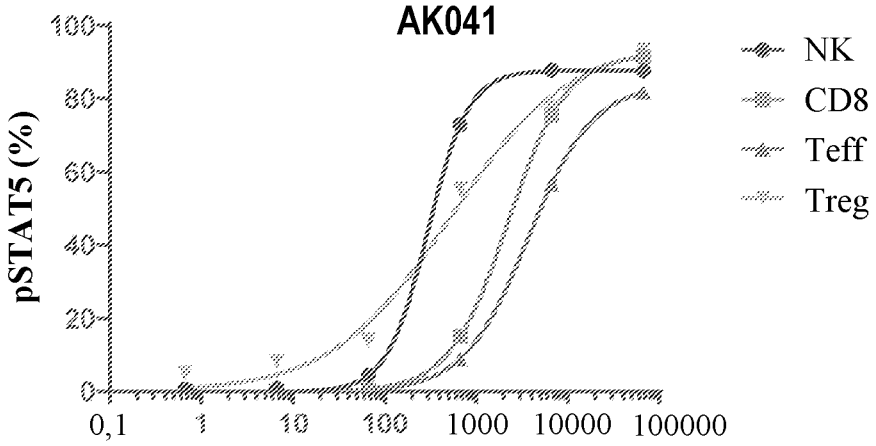
ФИГ. 8B


AK032
pSTAT5 (%)
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
1000
10000
100000
NK
CD8
Teff
Treg

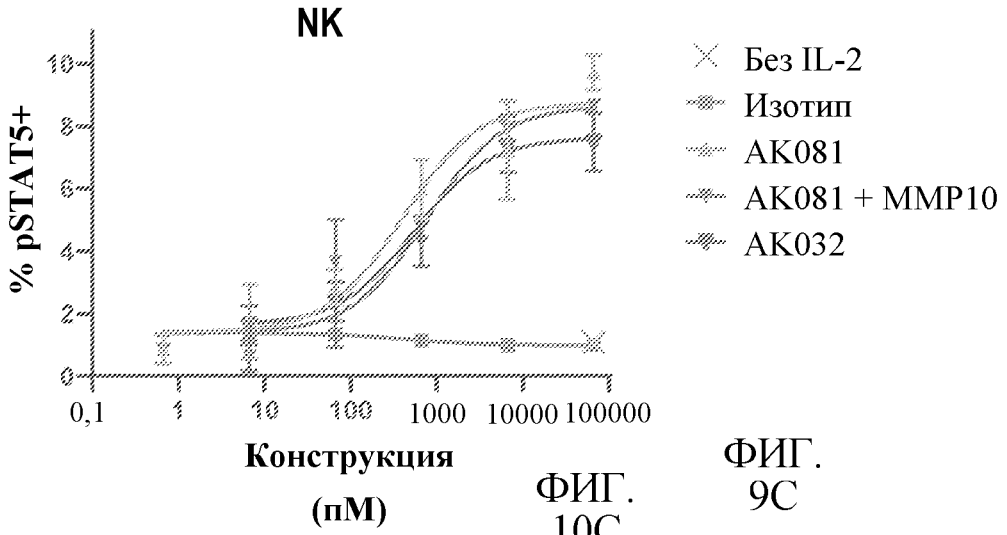
ФИГ. 8C


AK035
pSTAT5 (%)
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
1000
10000
100000
NK
CD8
Teff
Treg

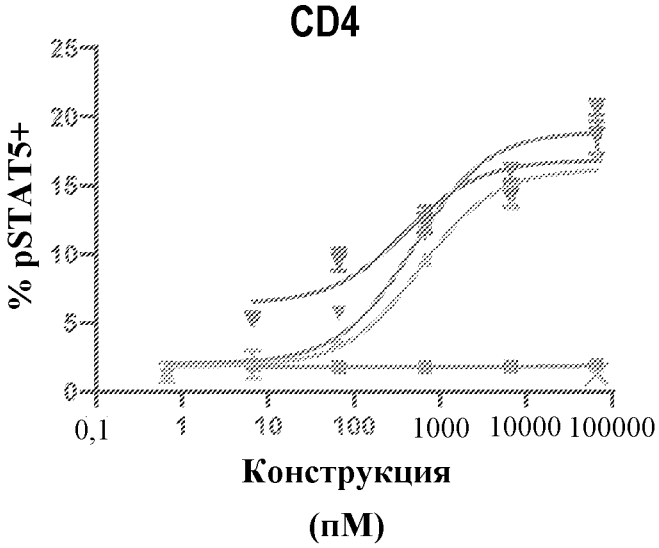
ФИГ. 8D


AK041
pSTAT5 (%)
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
1000
10000
100000
NK
CD8
Teff
Treg

ФИГ. 9A

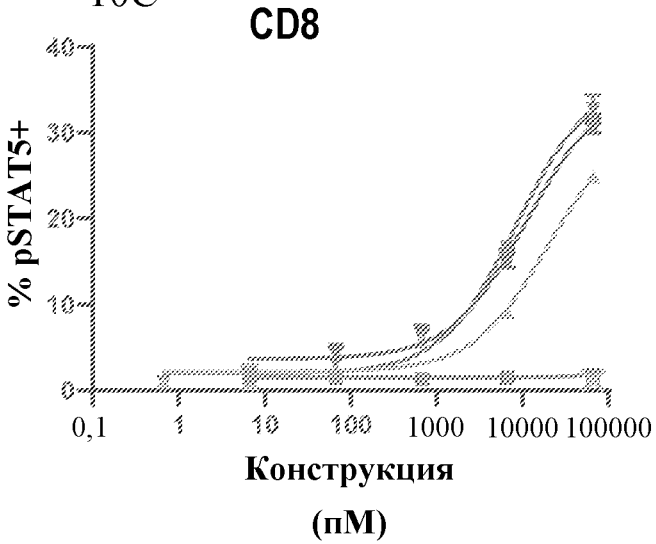


ФИГ. 9B

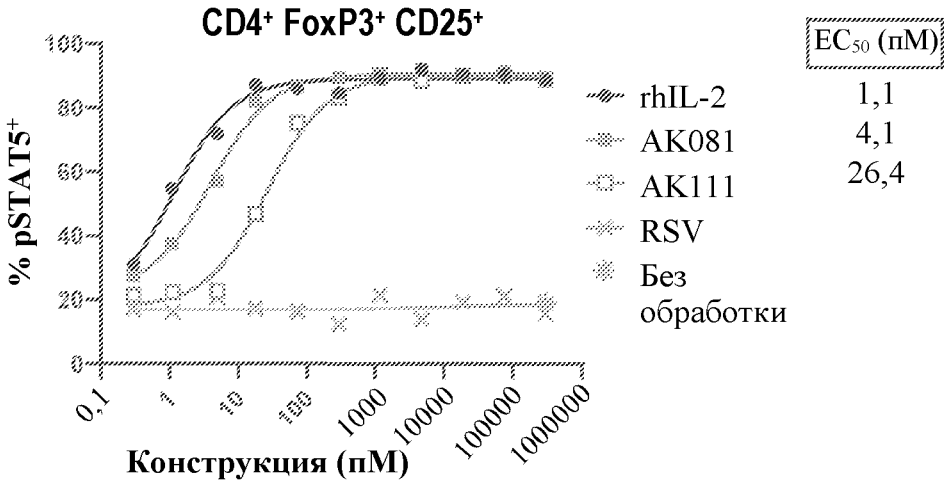


ФИГ. 10C

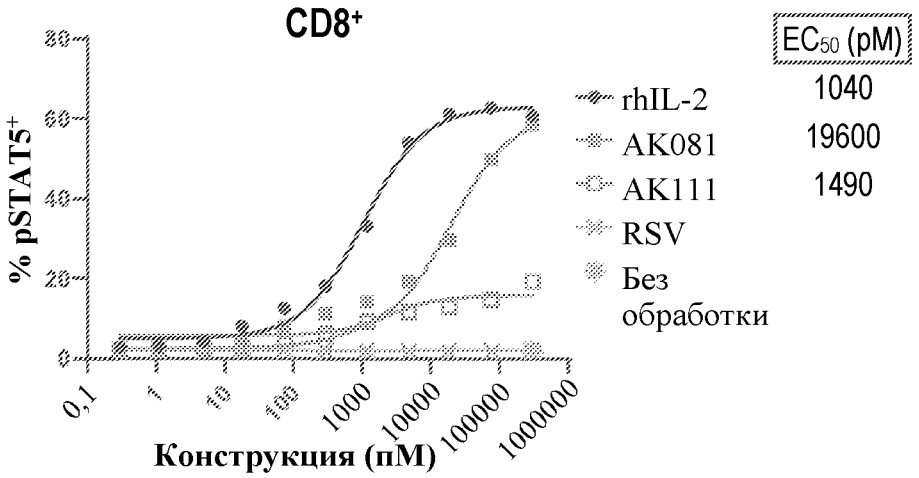
ФИГ. 9C



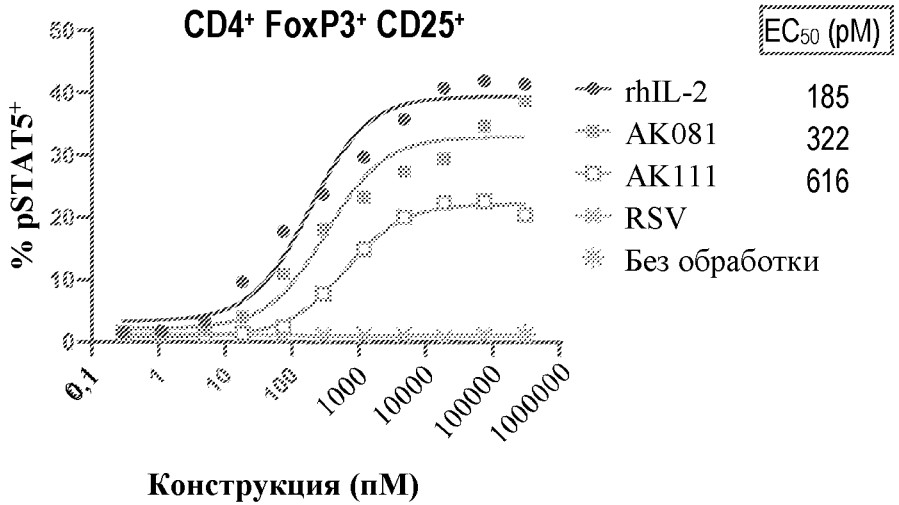
ФИГ. 10A



ФИГ. 10B



ФИГ. 10C

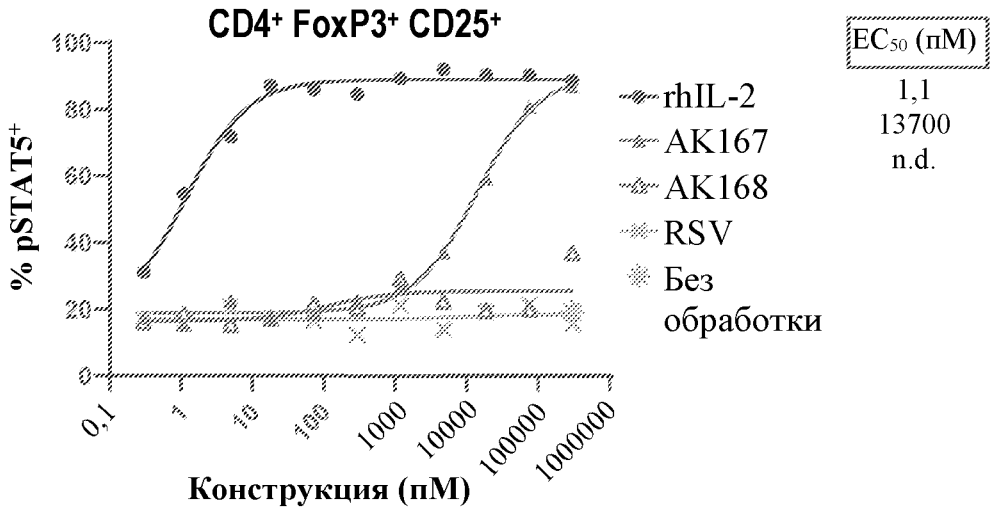


ФИГ. 10D

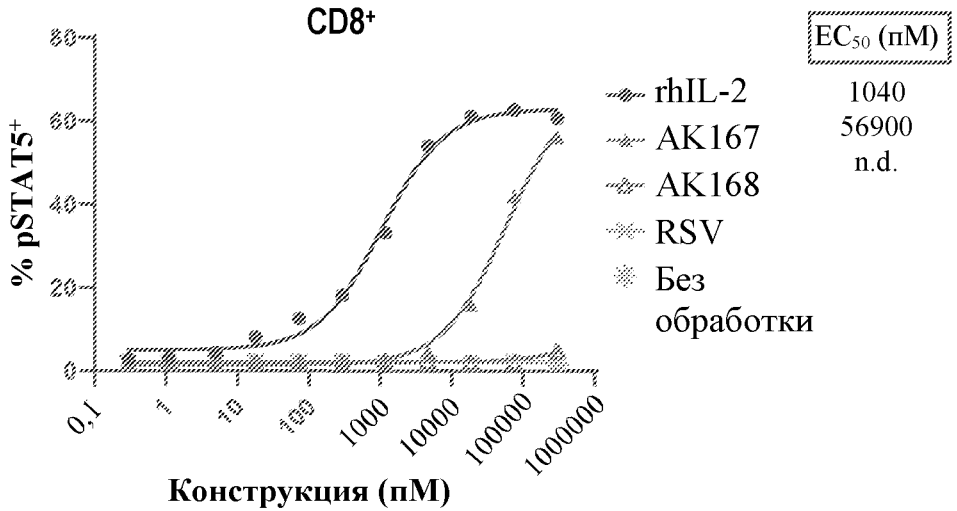
Конструкция	FoxP3+ T_{reg}		CD4+ T_{help}		CD8+ T_{cyto}	
	EC_{50} (пМ)	Кратность изменения	EC_{50} (пМ)	Кратность изменения	EC50 (пМ)	Кратность изменения
rhIL-2	1,1		1040		185	
AK081	4,1	3,7	19600	18,8	322	1,7
AK111	26,4	24,0	1490*	1,4*	616	3,3

**С помощью Prism удалось найти значение с наилучшим приближением, но не удалось рассчитать полный доверительный интервал. Это значение с наилучшим приближением следует интерпретировать с осторожностью.*

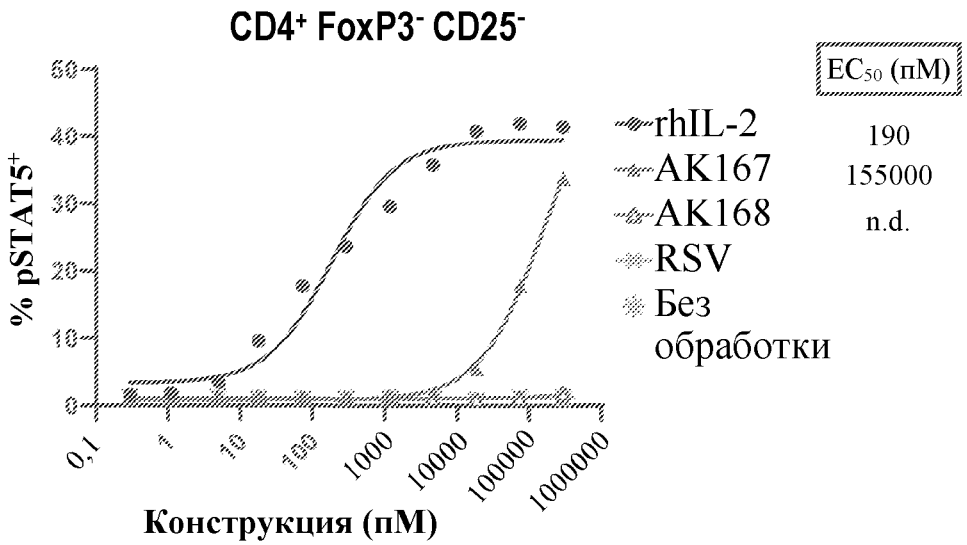
ФИГ. 11A



ФИГ. 11B



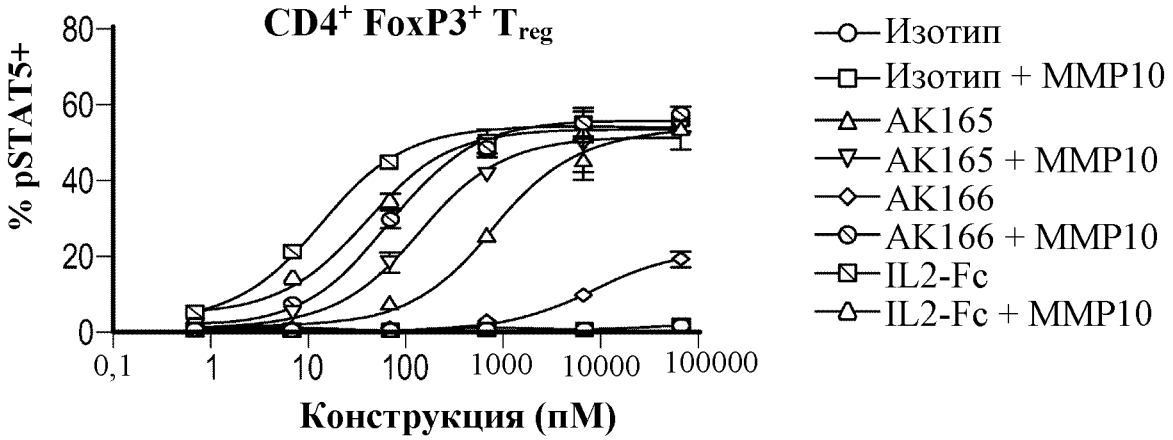
ФИГ. 11C



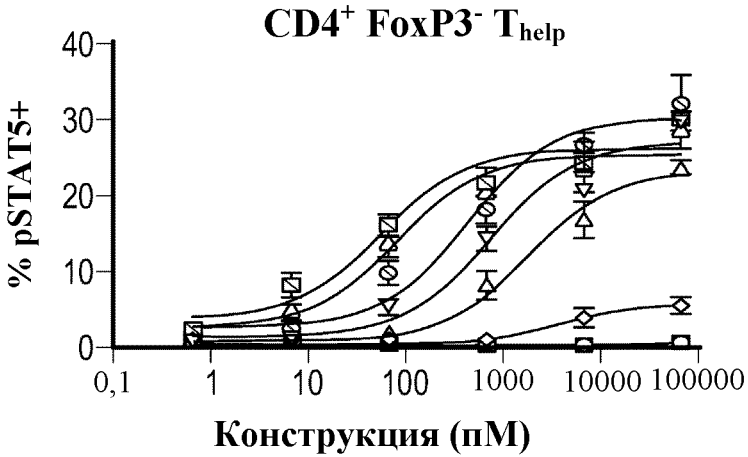
ФИГ. 11D

Конструкция	FoxP3+ T_{reg}		CD4+ T_{help}		CD8+ T_{cyto}	
	EC_{50} (nM)	*Кратность изменения*	*EC_{50} (nM)*	*Кратность изменения*	*EC_{50} (nM)*	*Кратность изменения*
rhIL-2	1,1		1040		190	
AK167	13700	12455	56900	55	155000	816
AK168	*n.d.*		*n.d.*		*n.d.*	

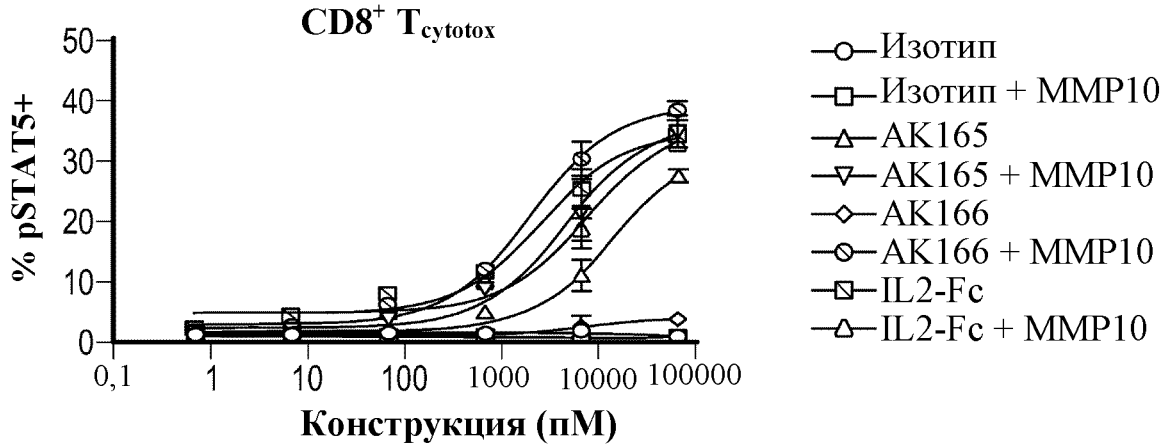
ФИГ. 12A



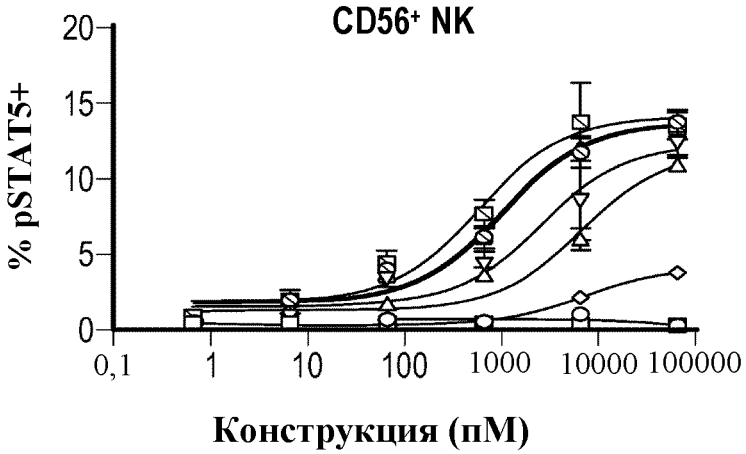
ФИГ. 12B



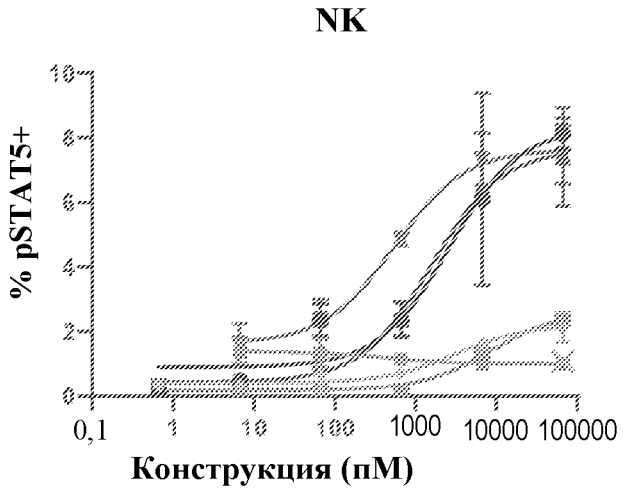
ФИГ. 12C



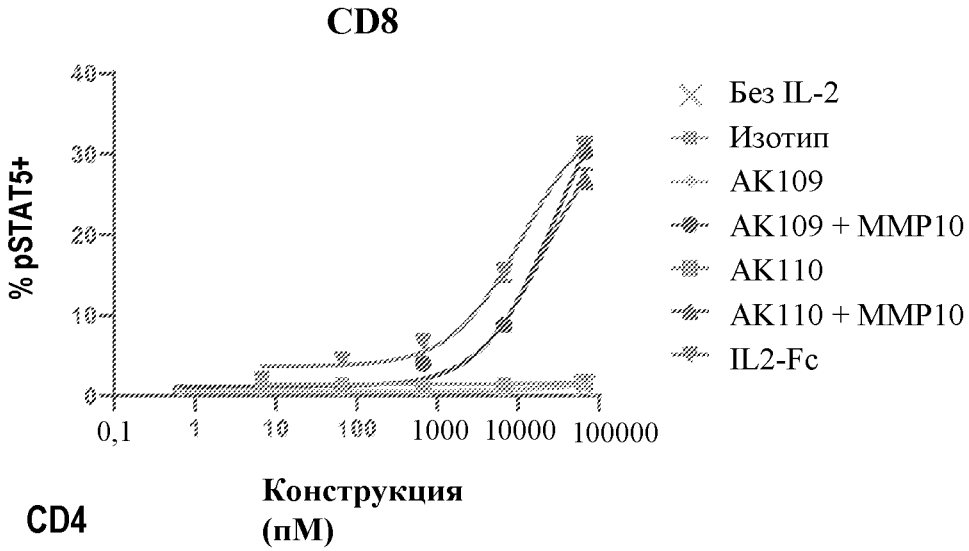
ФИГ. 12D



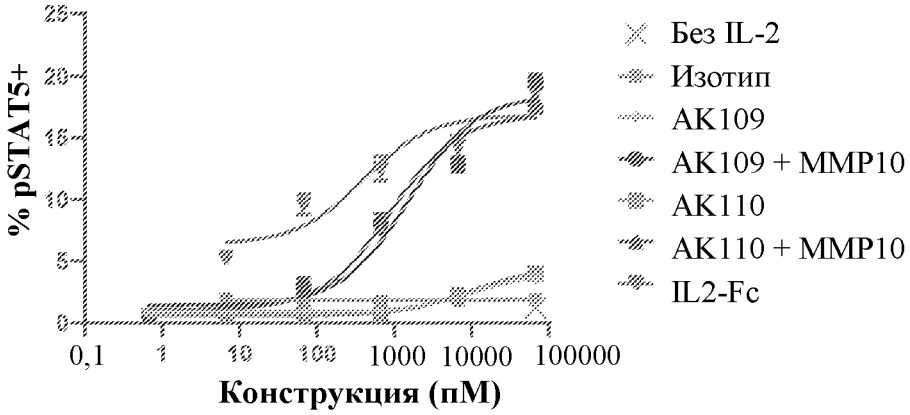
ФИГ. 13A



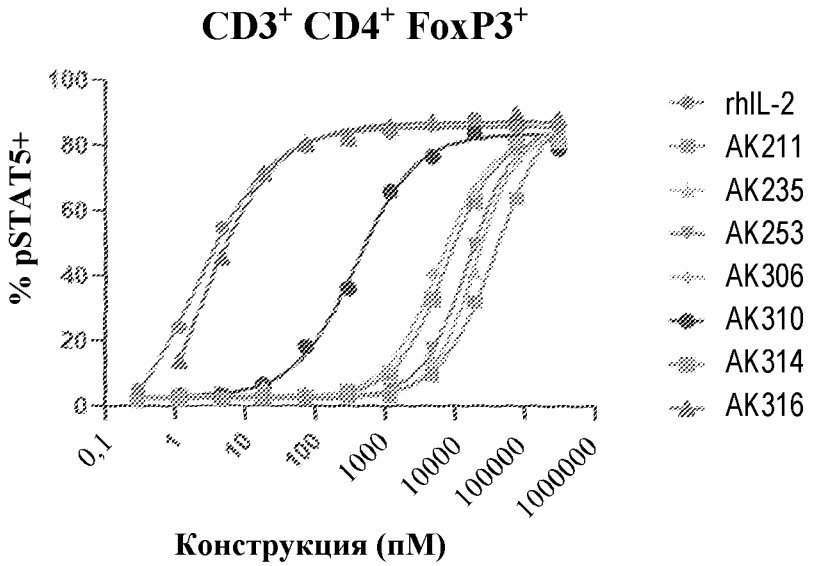
ФИГ. 13B



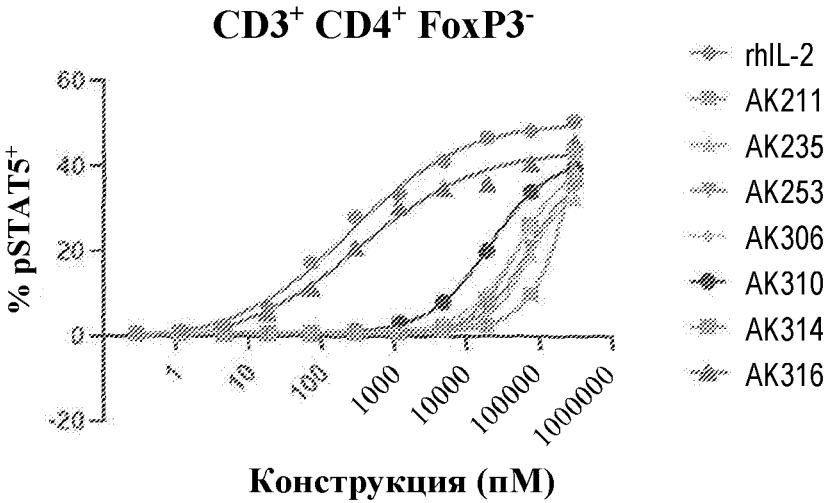
ФИГ. 13C



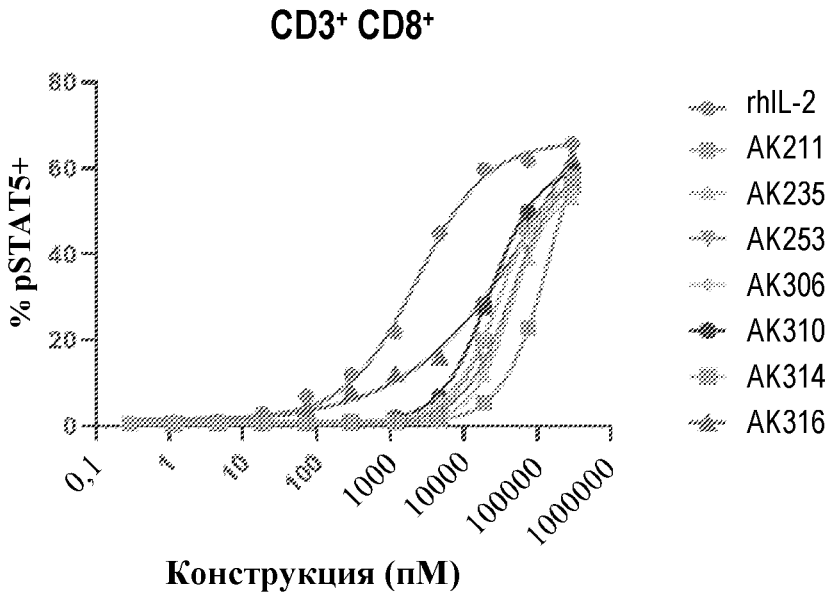
ФИГ. 14А



ФИГ. 14В



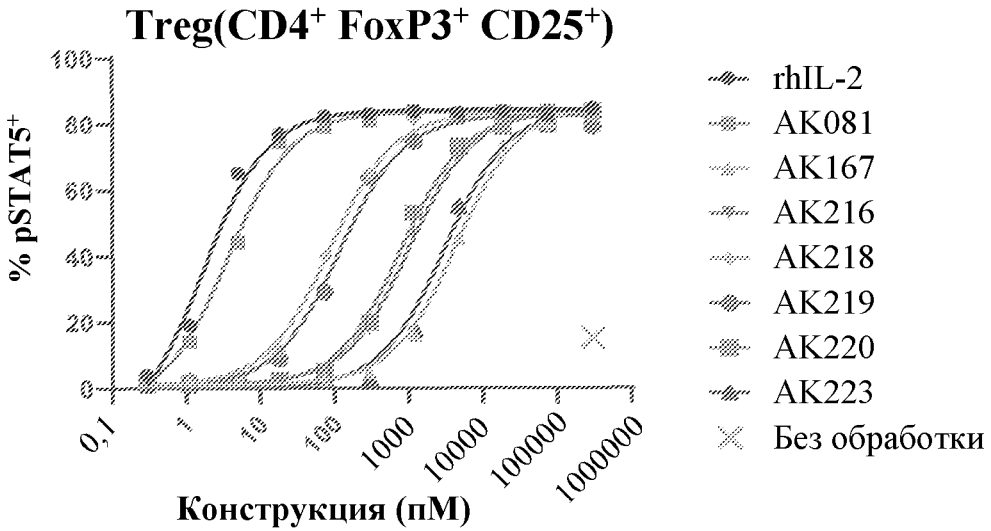
ФИГ. 14C



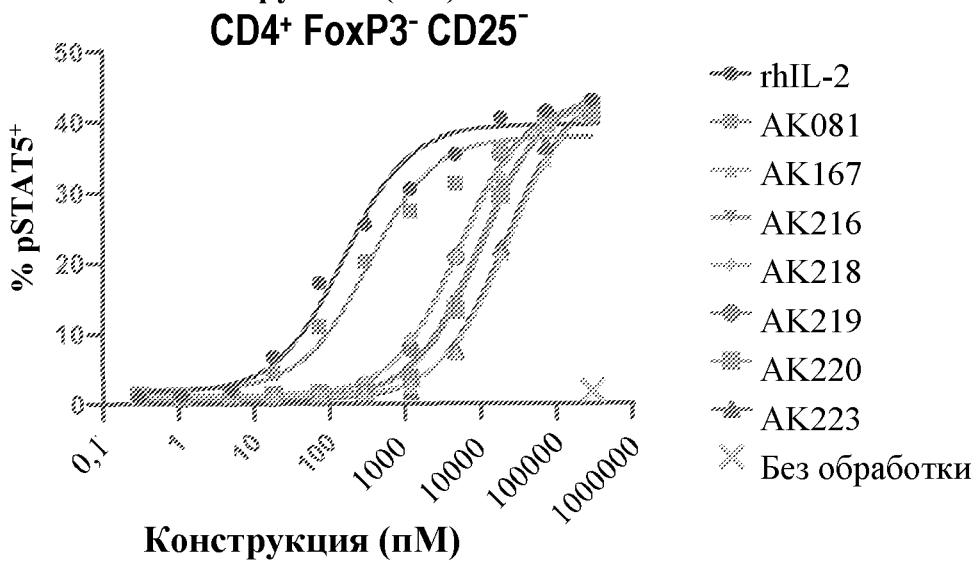
ФИГ. 14D

	CD3+CD4+FoxP3+	CD3+CD4+FoxP3-	CD3+CD8+
Конструкция	**EC_{50}(pM)**	**EC_{50}(pM)**	**EC_{50}(pM)**
rhIL-2	1,94	247	2300
AK211	39500	*	164000
AK253	15400	75100	46400
AK235	19200	69500	44100
AK314	7250	49400	29500
AK306	5680	56300	28800
AK310	373	20800	22300
AK316	1,73	311	167000**

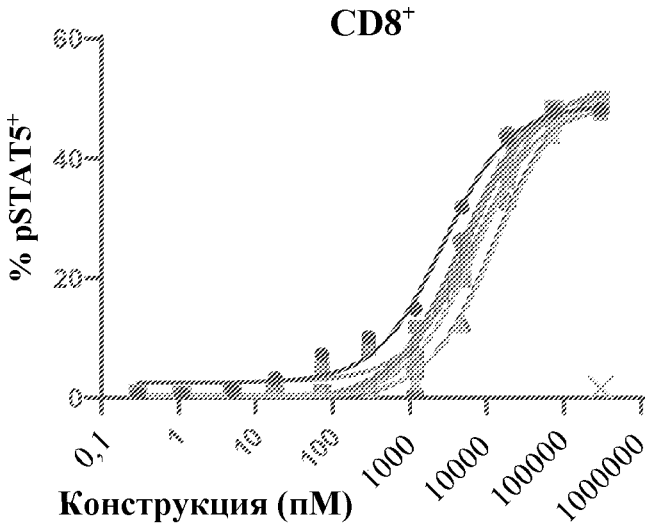
ФИГ. 15A



ФИГ. 15B



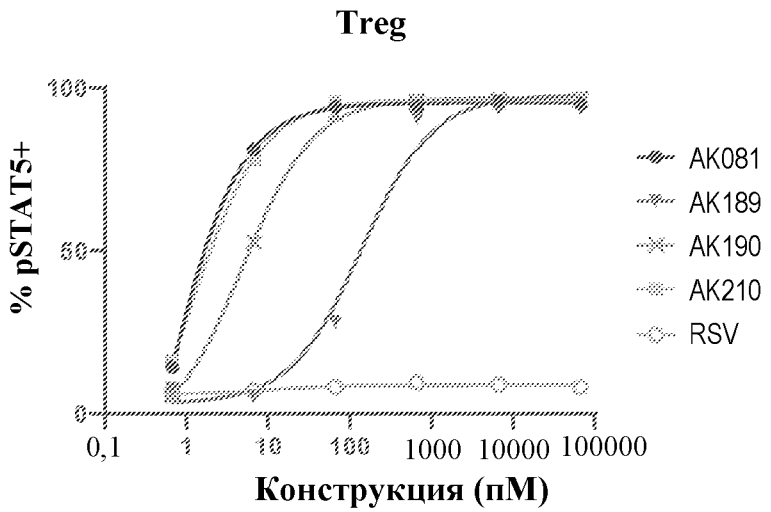
ФИГ. 15C



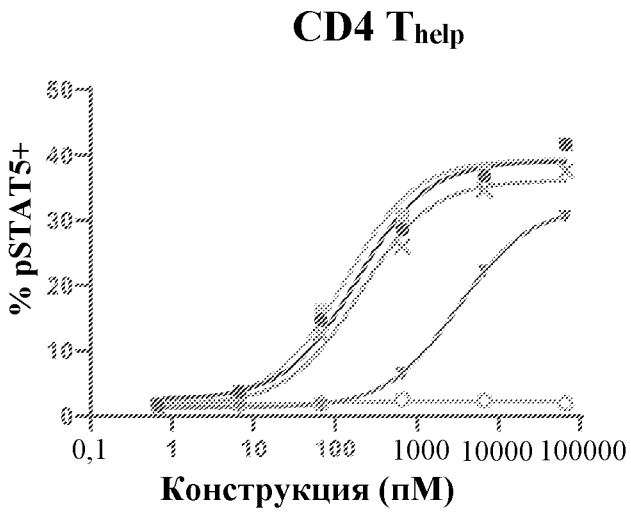
ФИГ. 15D

Конструкция	$FoxP3^+T_{reg}$	$CD4^+T_{help}$	$CD8^+T_{cyto}$
	EC_{50}(пМ)	EC_{50}(пМ)	EC_{50}(пМ)
rhIL-2	1,67	154	2710
AK081	3,59	332	6700
AK167	4390	22900	13200
AK216	1020	9200	5490
AK218	86,7	5270	7550
AK219	117	5030	4570
AK220	782	10900	7650
AK223	3040	20200	12600

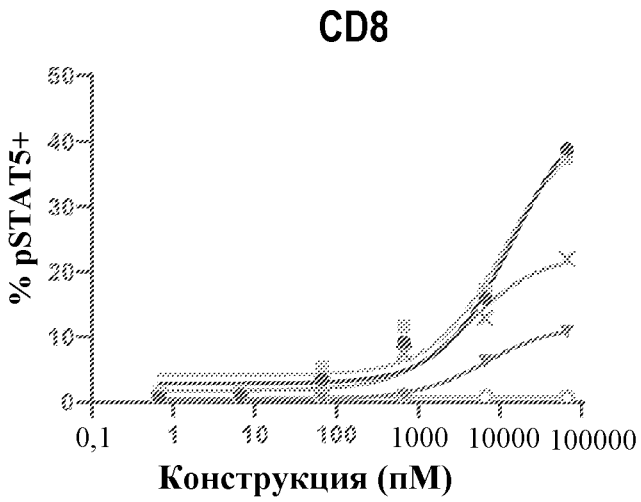
ФИГ. 16A



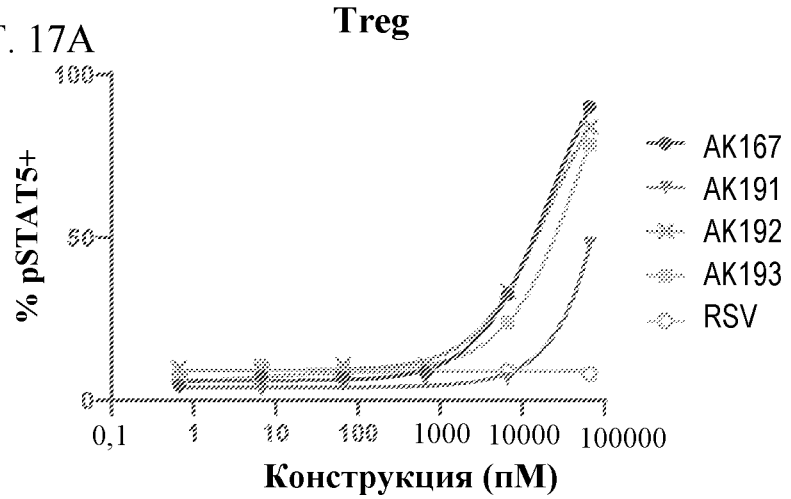
ФИГ. 16B



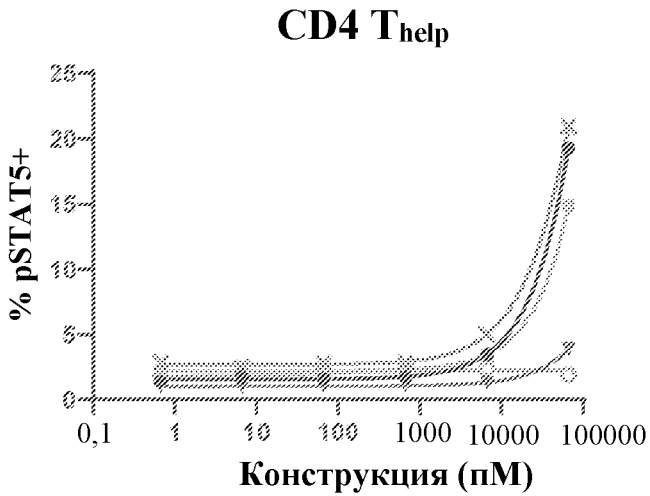
ФИГ. 16C



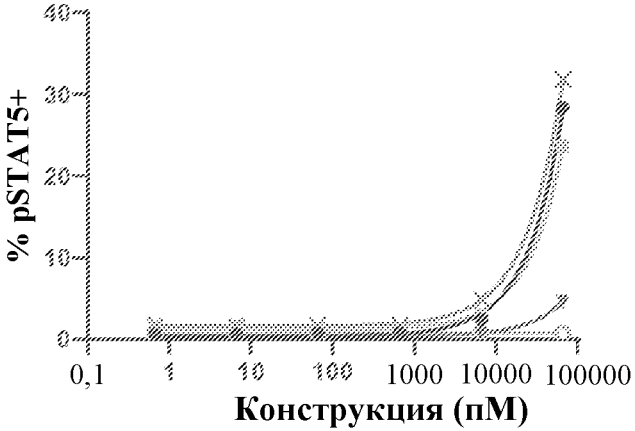
ФИГ. 17A



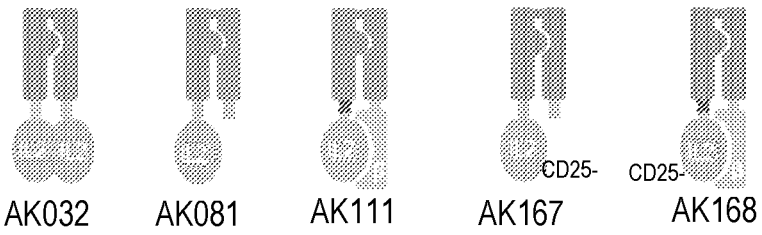
ФИГ. 17B



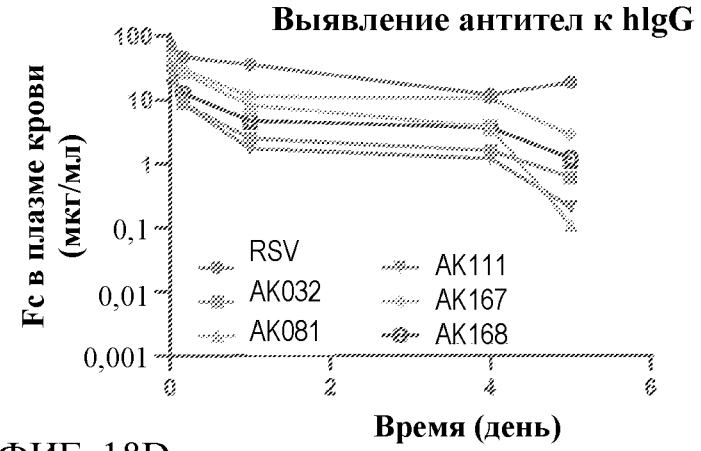
ФИГ. 17C



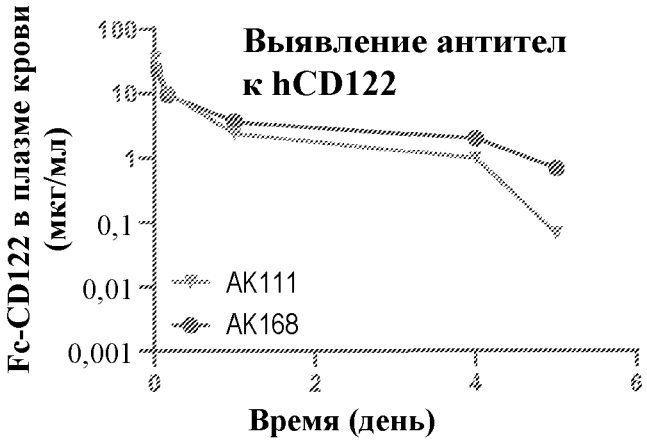
ФИГ. 18A



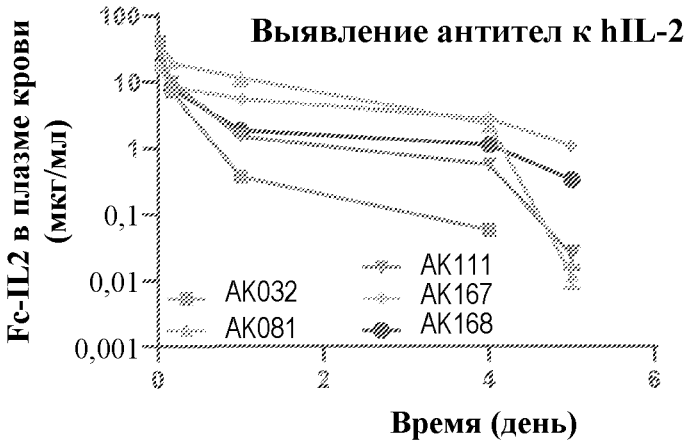
ФИГ. 18B



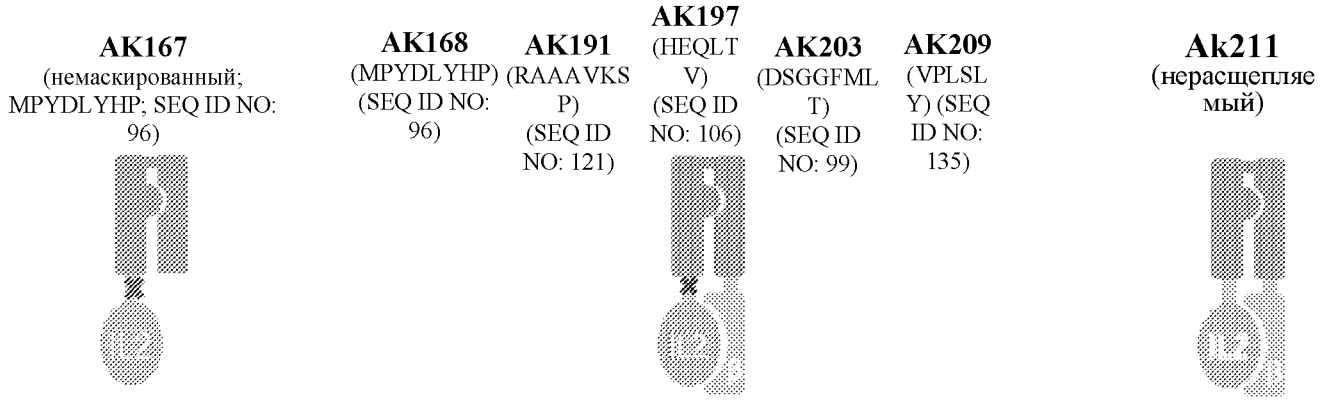
ФИГ. 18C



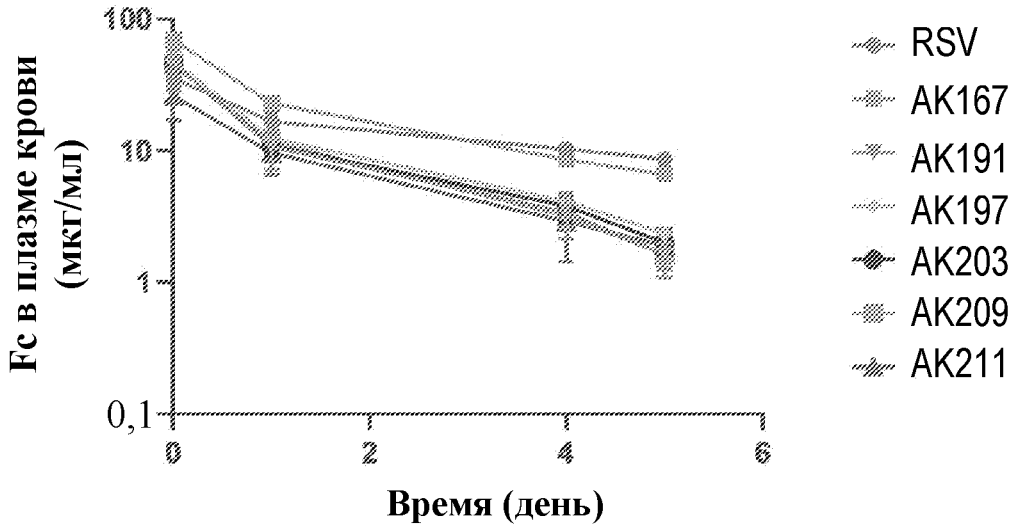
ФИГ. 18D



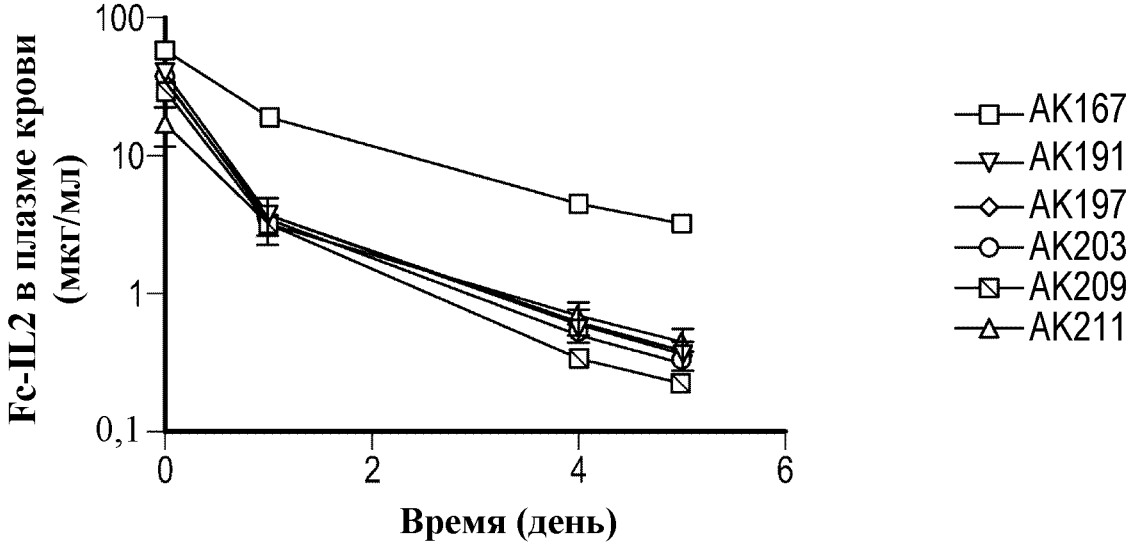
ФИГ. 19A



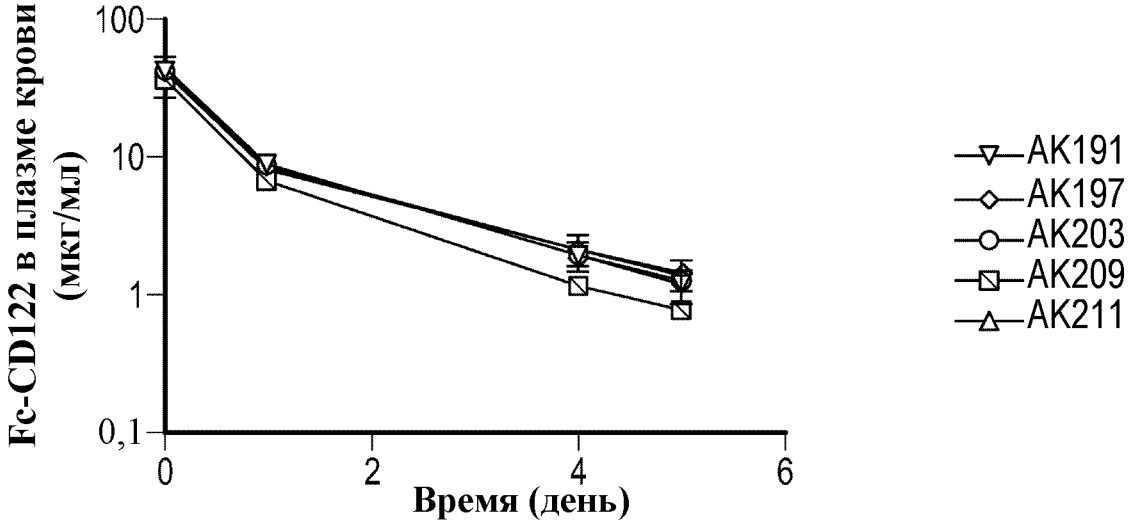
ФИГ. 19B



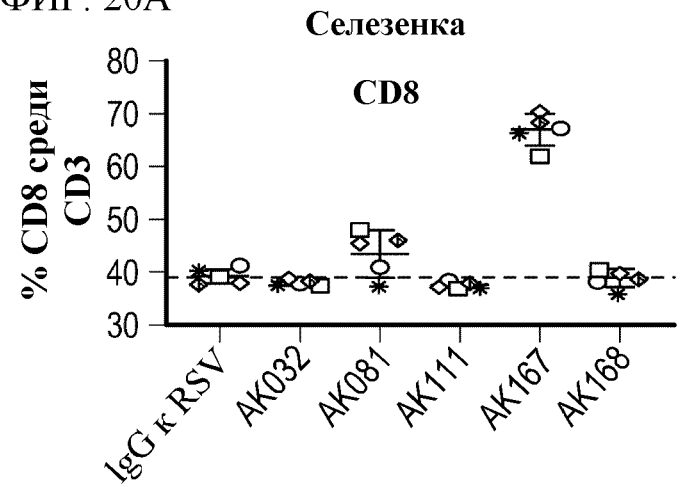
ФИГ. 19C



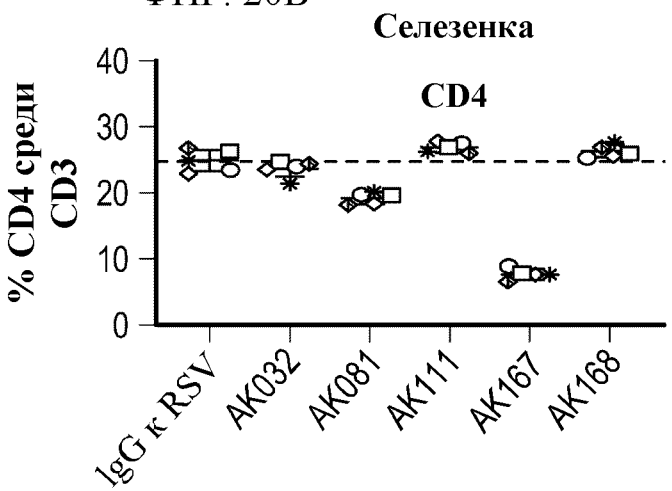
ФИГ. 19D



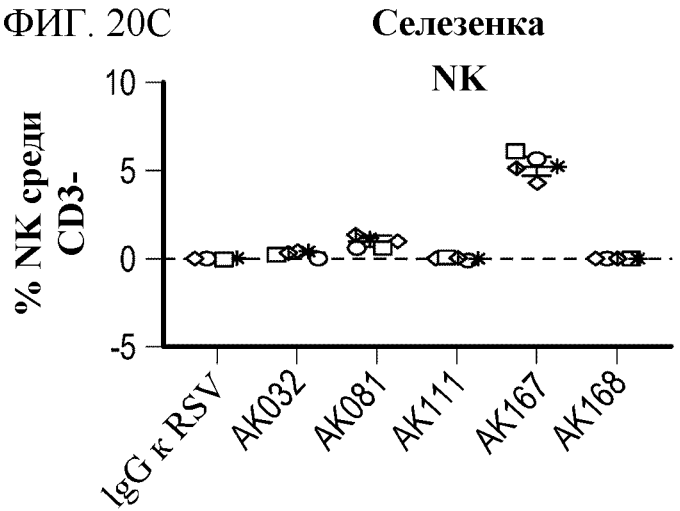
ФИГ. 20A



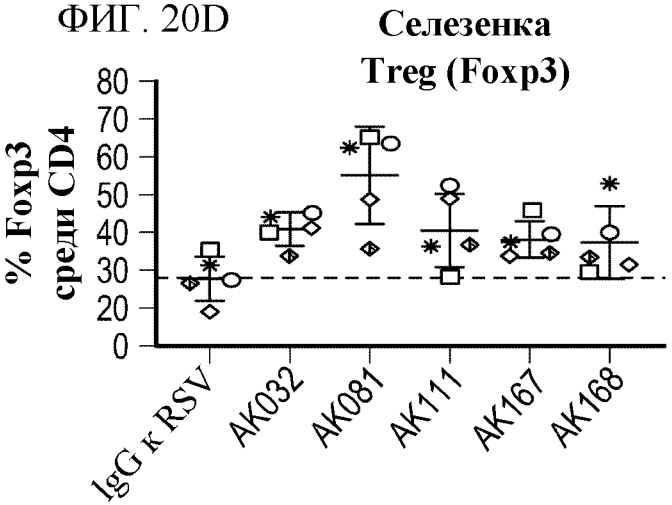
ФИГ. 20B



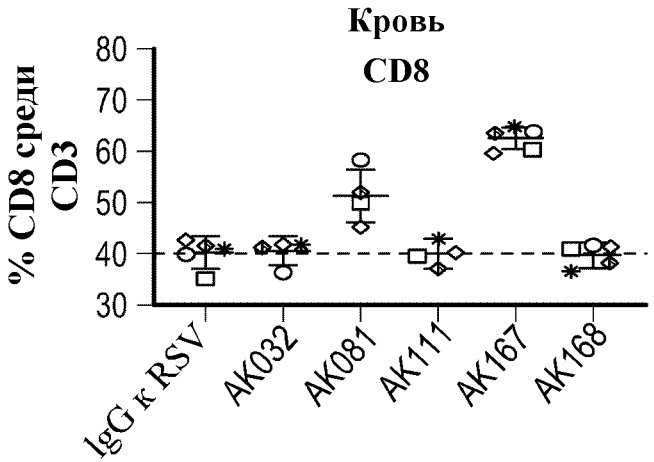
ФИГ. 20C



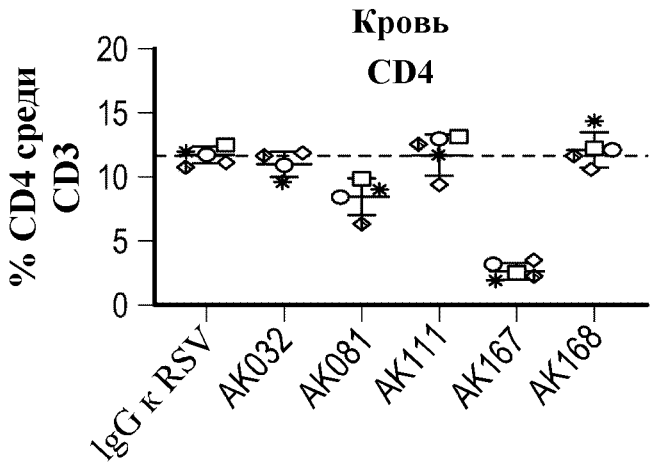
ФИГ. 20D



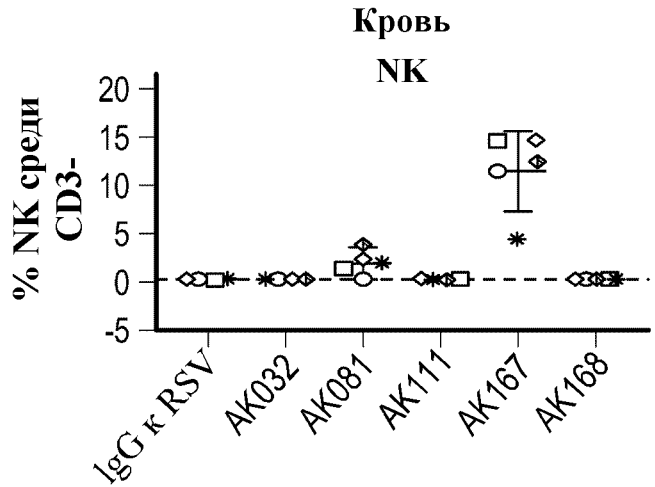
ФИГ. 20E



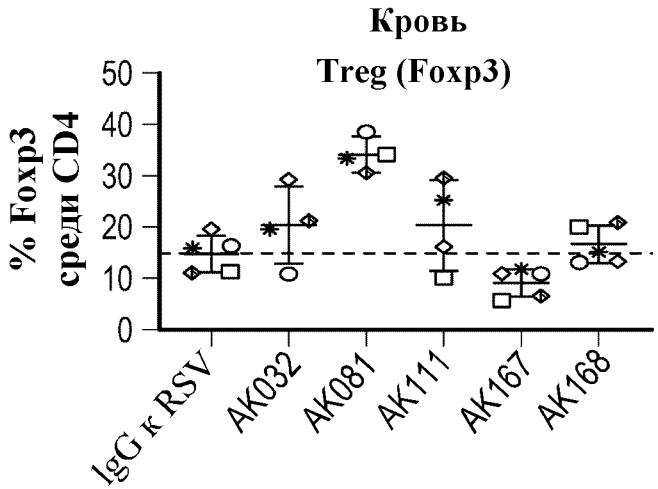
ФИГ. 20F



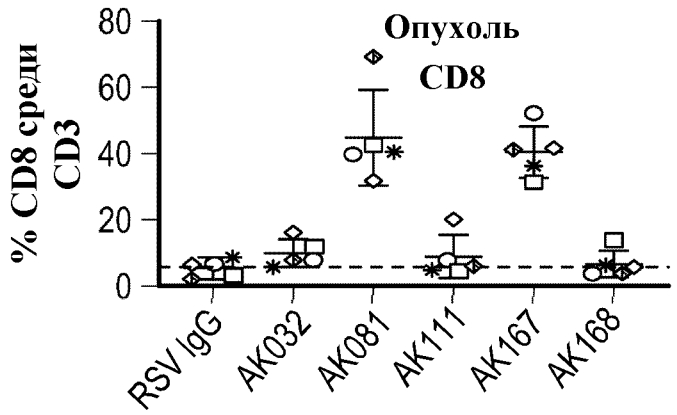
ФИГ. 20G



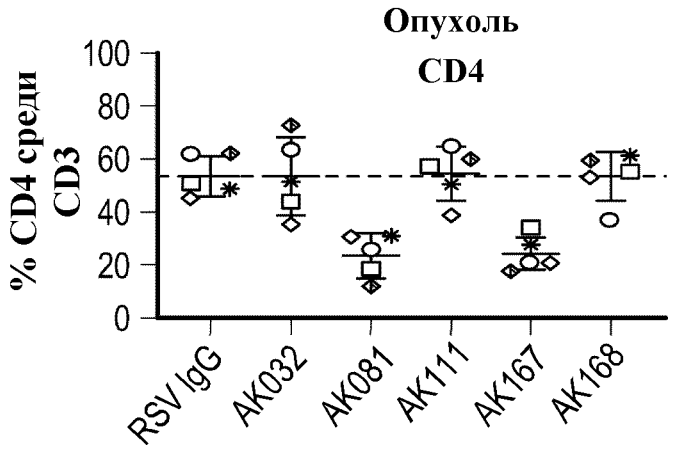
ФИГ. 20H



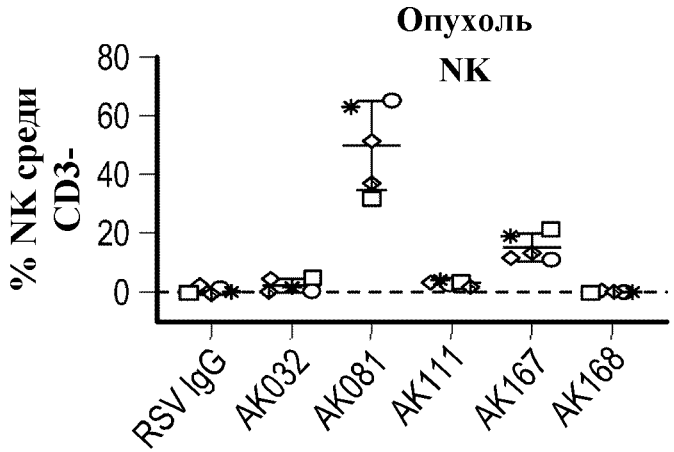
ФИГ. 20I



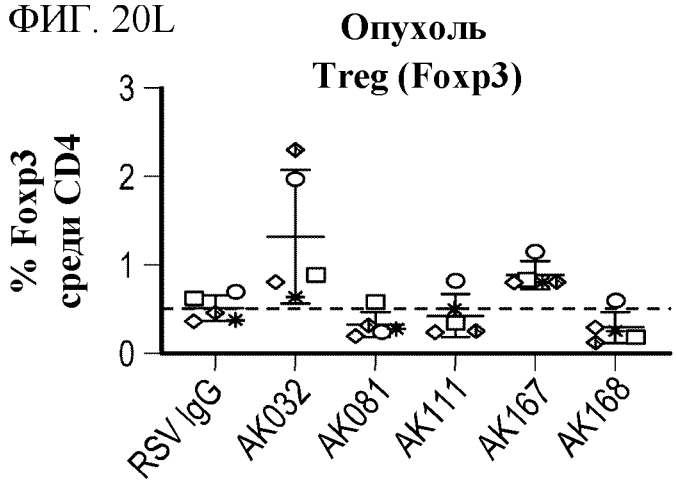
ФИГ. 20J



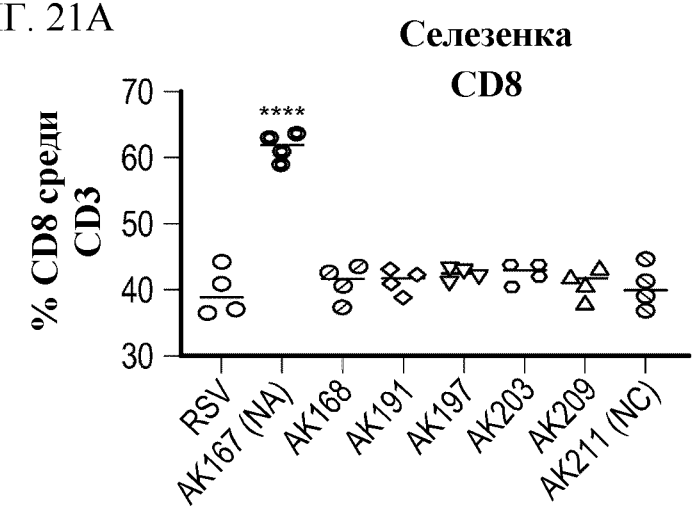
ФИГ. 20K



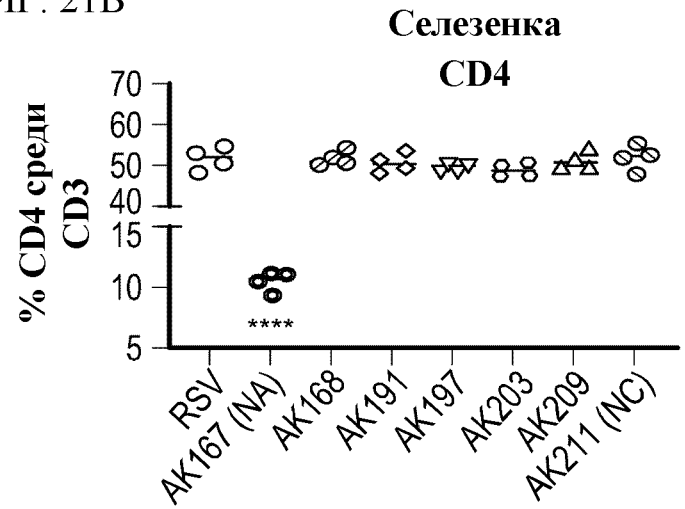
ФИГ. 20L



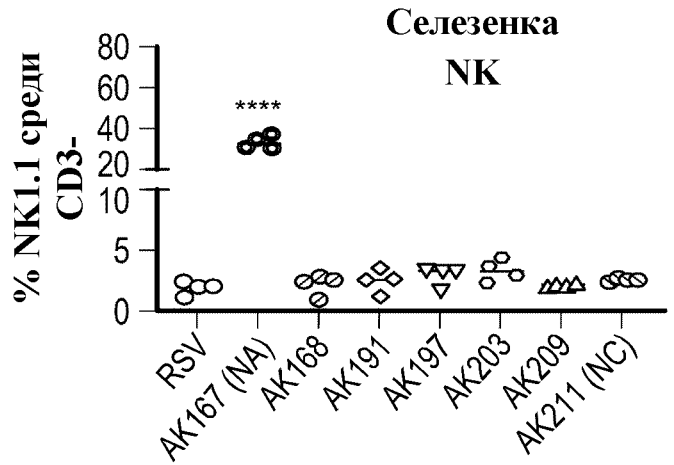
ФИГ. 21A



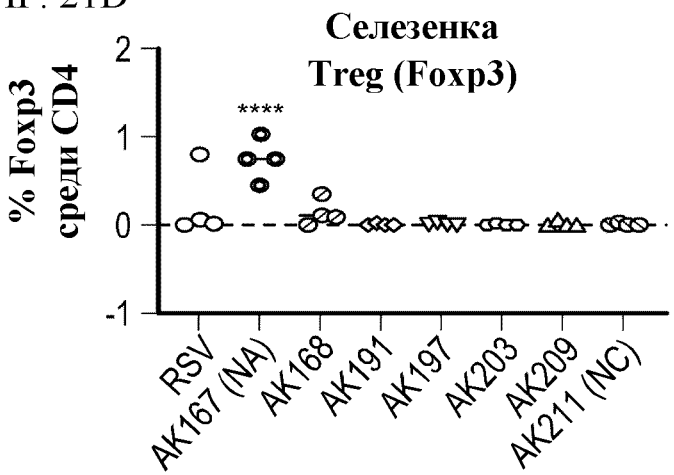
ФИГ. 21B



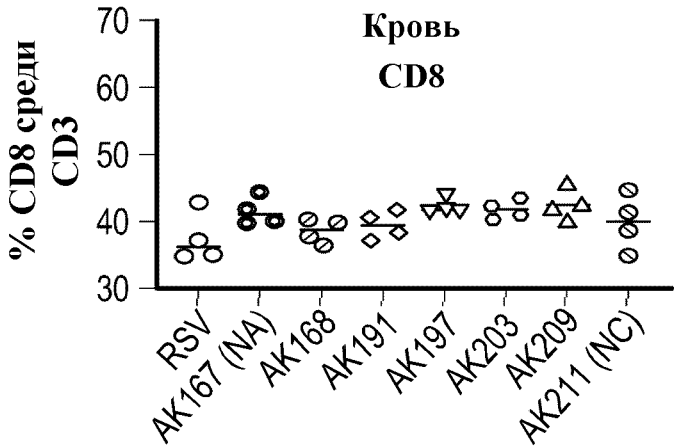
ФИГ. 21C



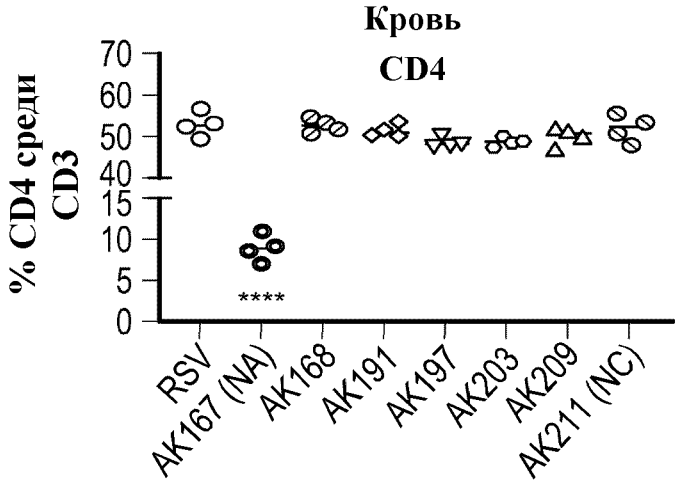
ФИГ. 21D



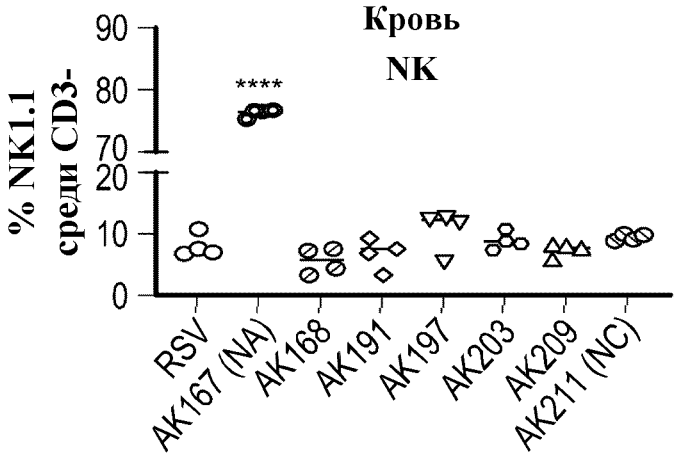
ФИГ. 21E



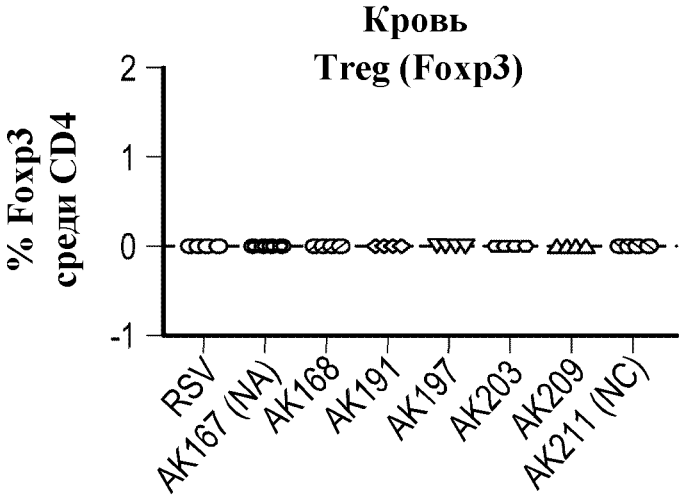
ФИГ. 21F



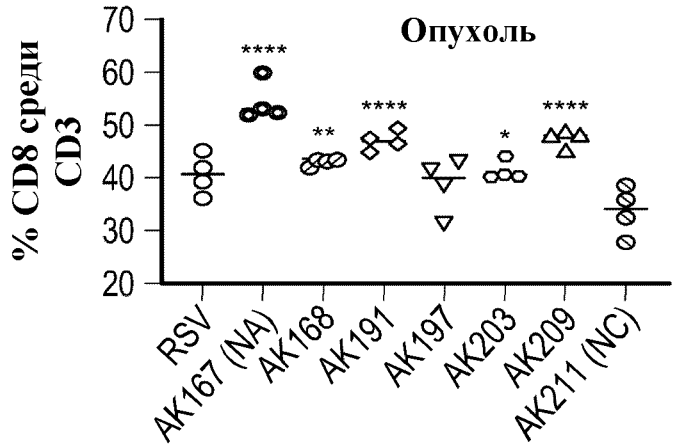
ФИГ. 21G



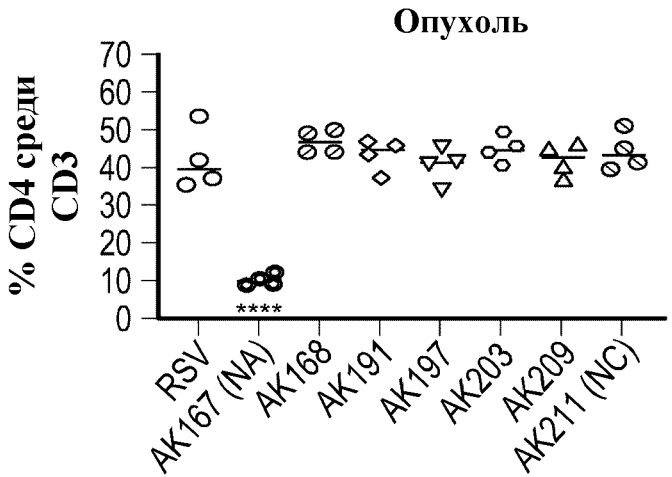
ФИГ. 21H



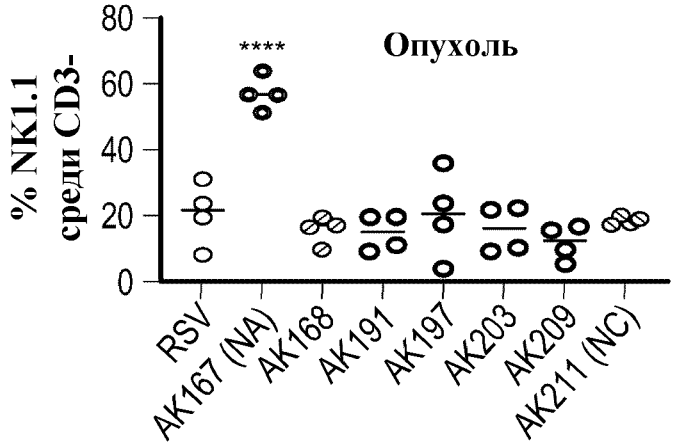
ФИГ. 21I



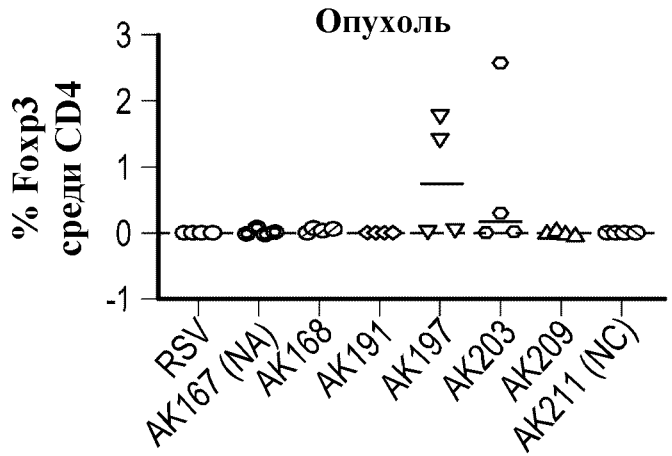
ФИГ. 21J



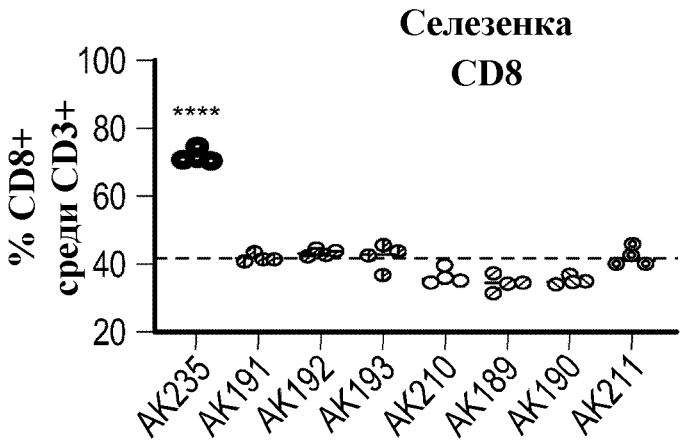
ФИГ. 21K



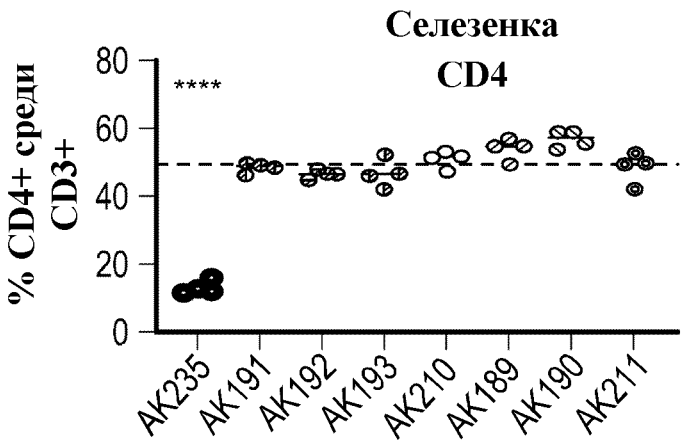
ФИГ. 21L



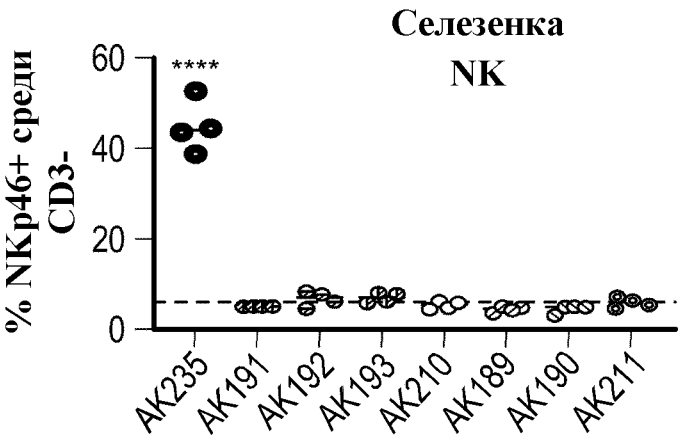
ФИГ. 22A



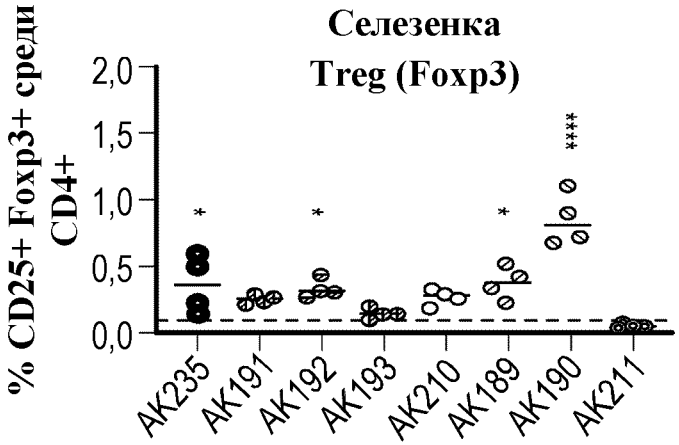
ФИГ. 22B



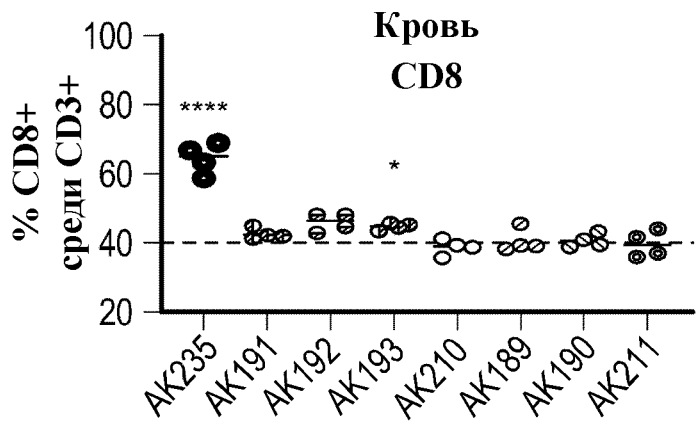
ФИГ. 22C



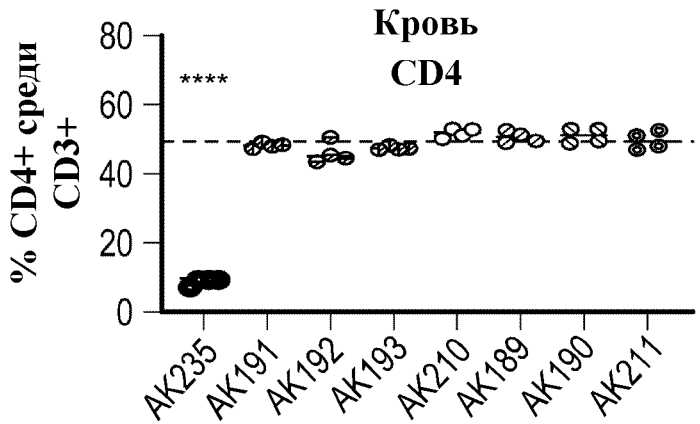
ФИГ. 22D



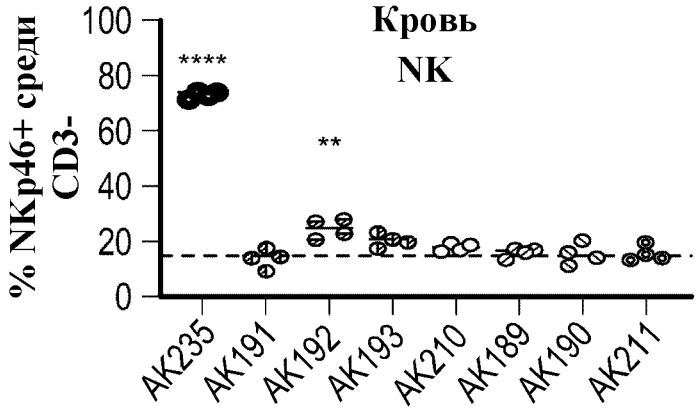
ФИГ. 22E



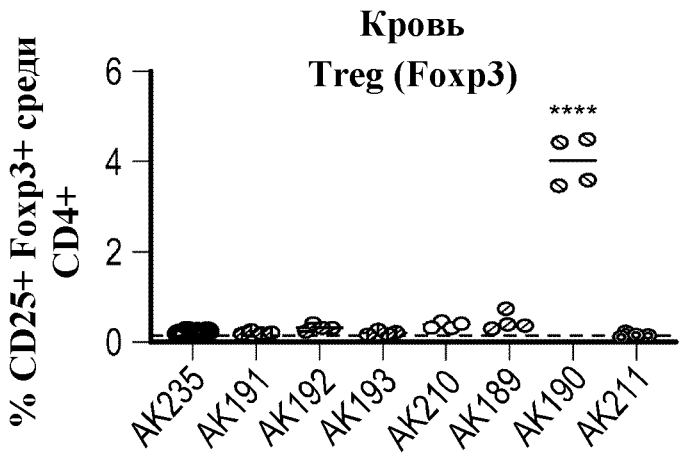
ФИГ. 22F



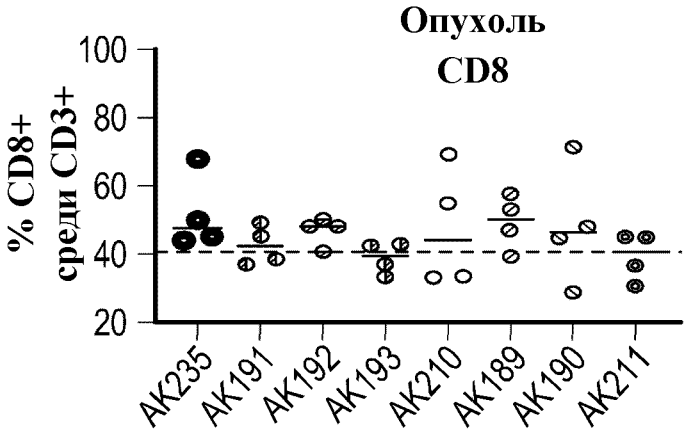
ФИГ. 22G



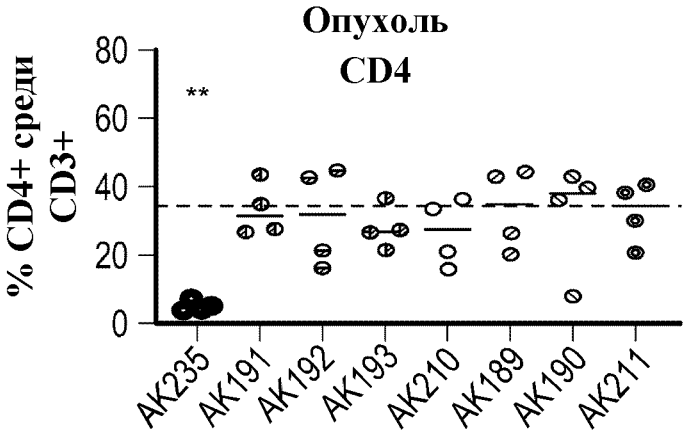
ФИГ. 22H



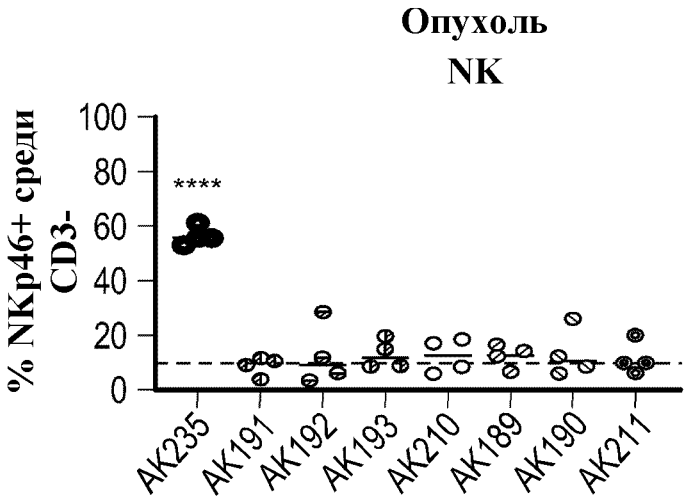
ФИГ. 22I



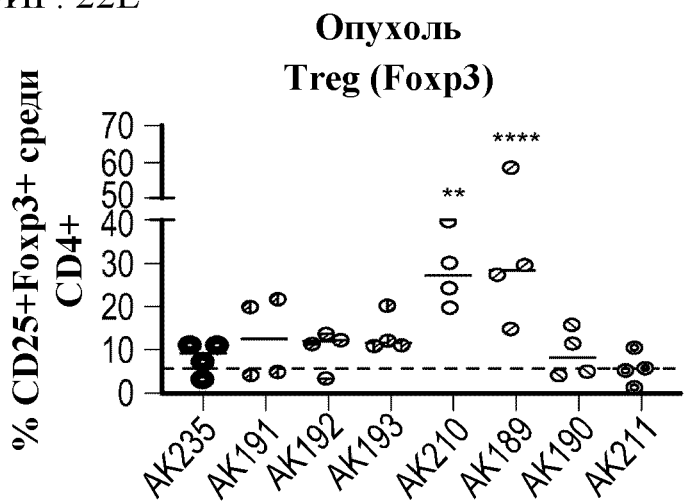
ФИГ. 22J



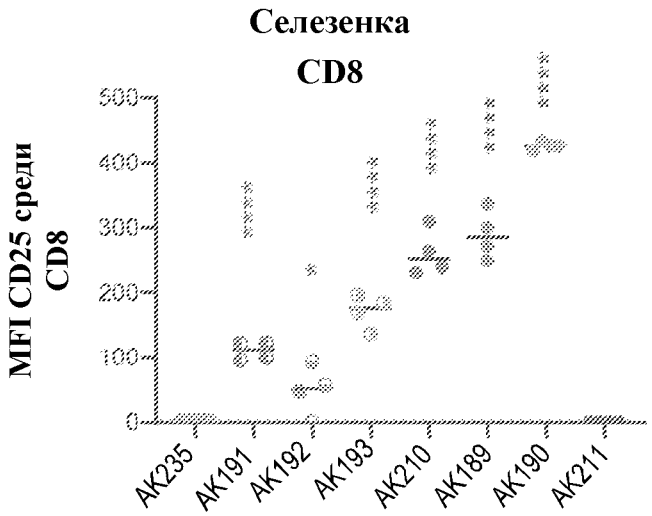
ФИГ. 22K



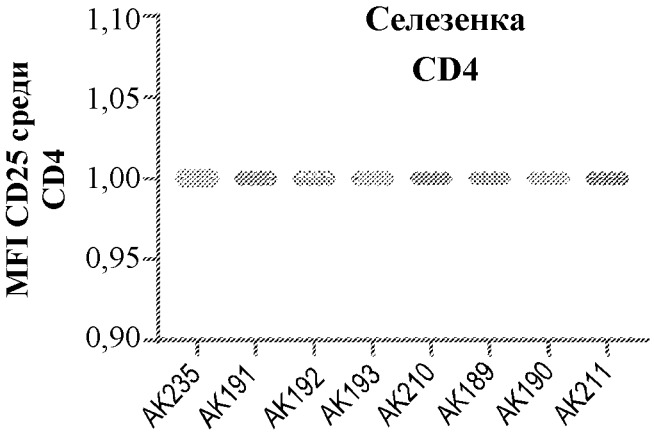
ФИГ. 22L



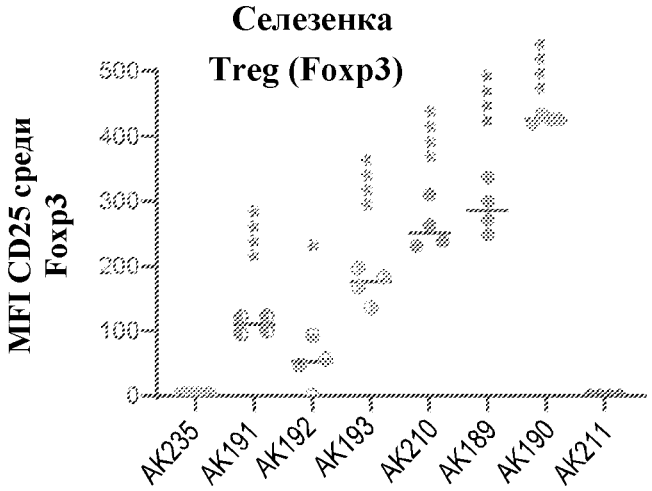
ФИГ. 23A



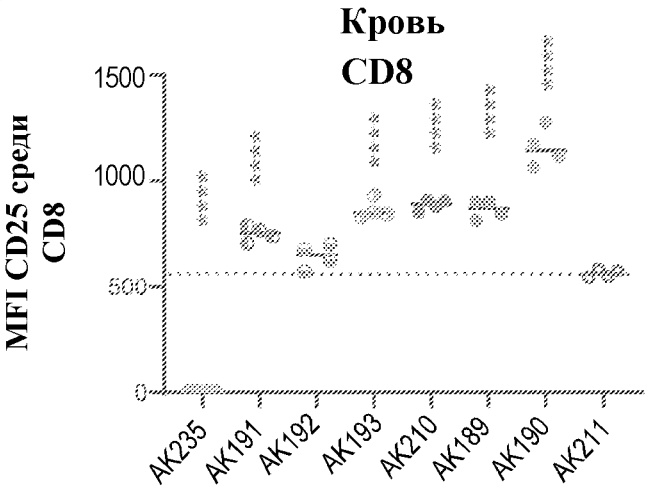
ФИГ. 23B



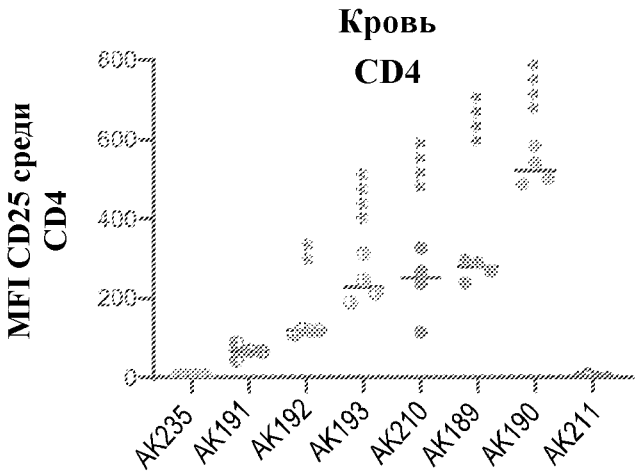
ФИГ. 23C



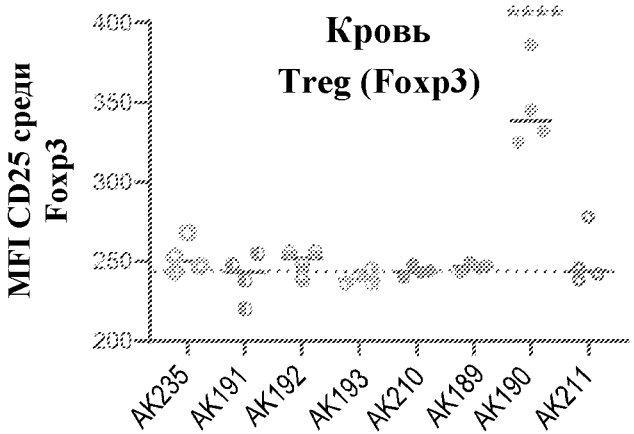
ФИГ. 23D



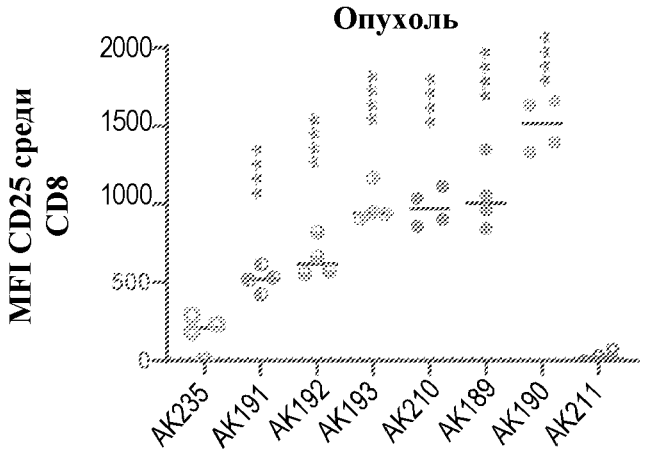
ФИГ. 23E



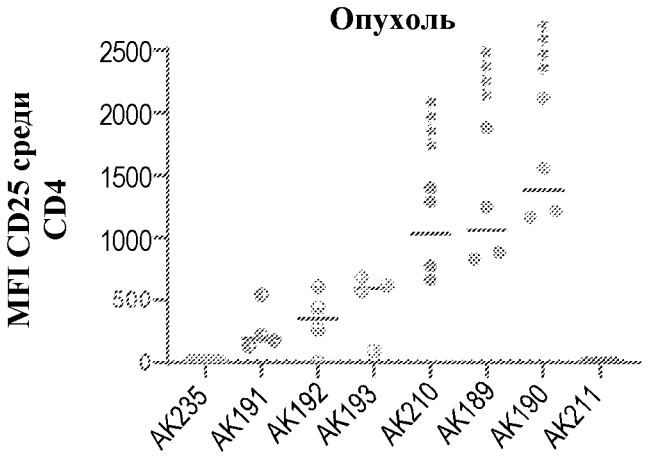
ФИГ. 23F



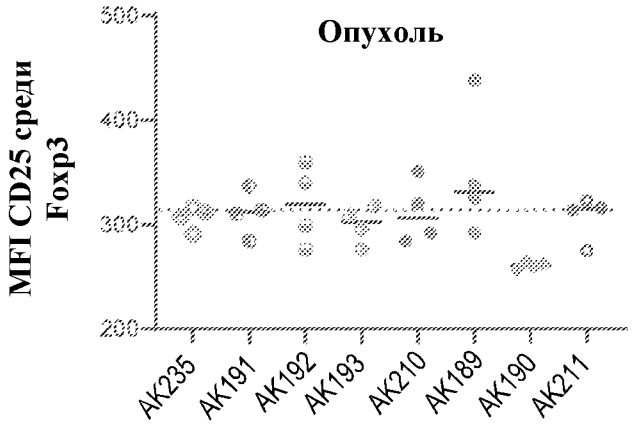
ФИГ. 23G



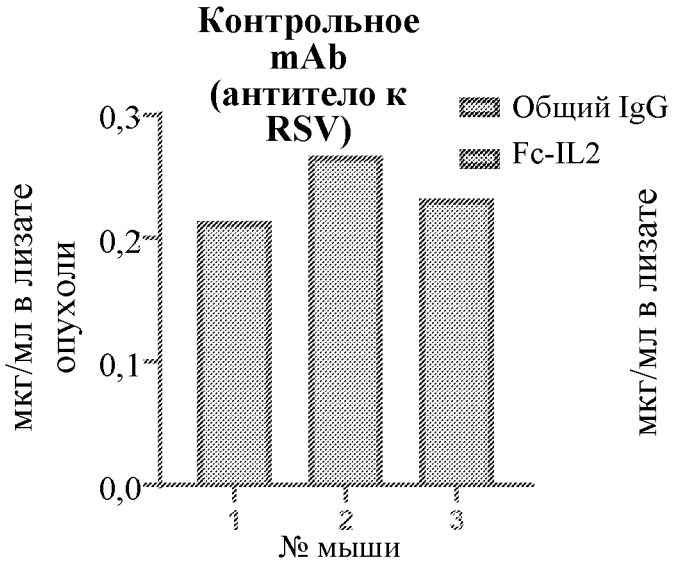
ФИГ. 23H



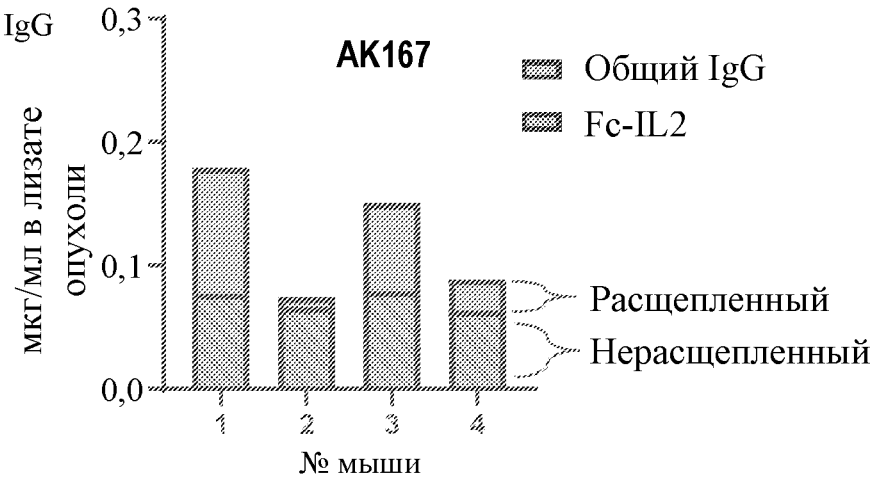
ФИГ. 23I



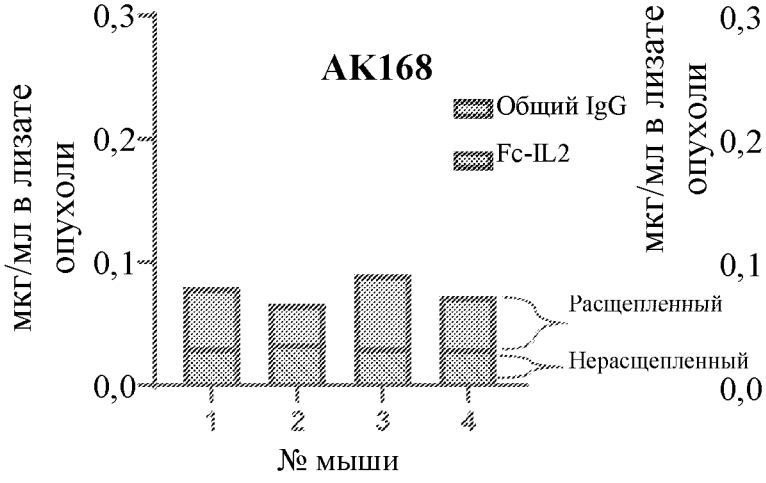
ФИГ. 24A



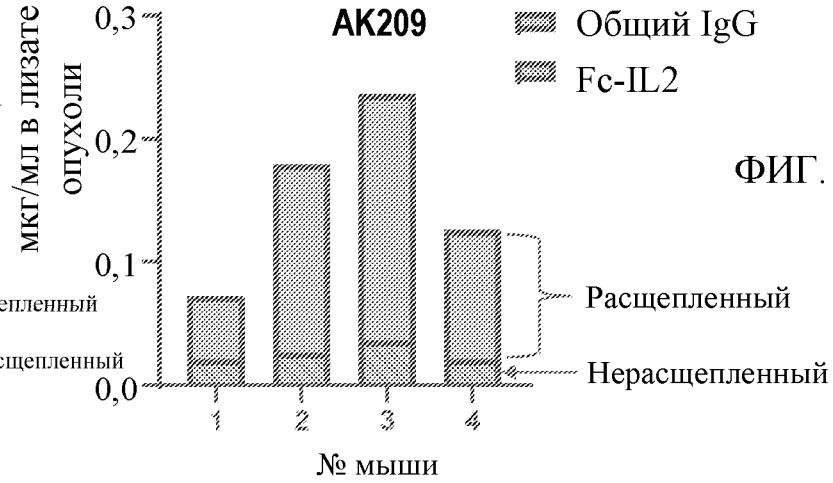
ФИГ. 24B

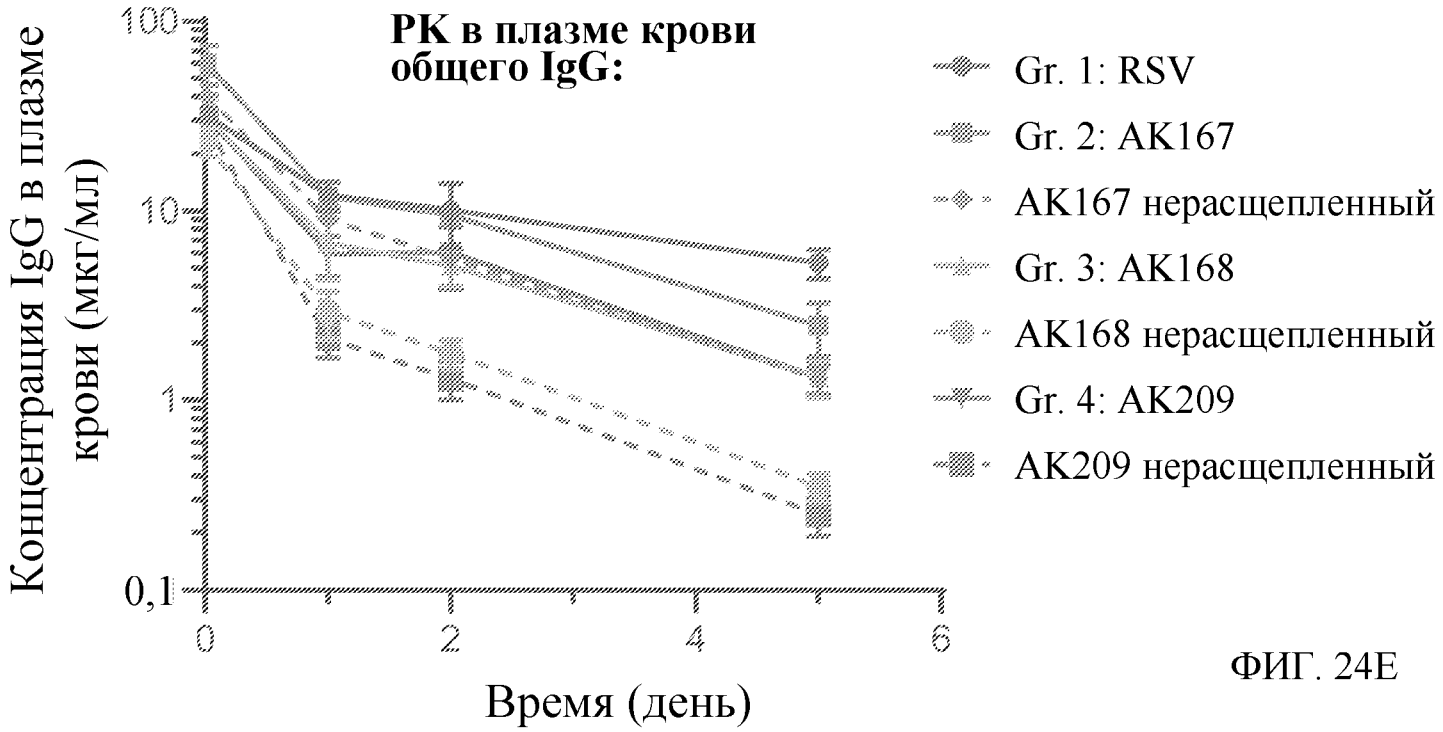


ФИГ. 24C



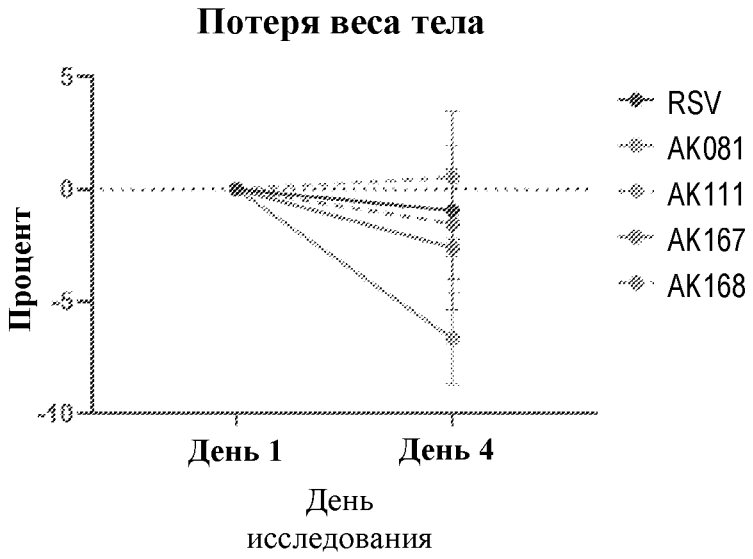
ФИГ. 24D



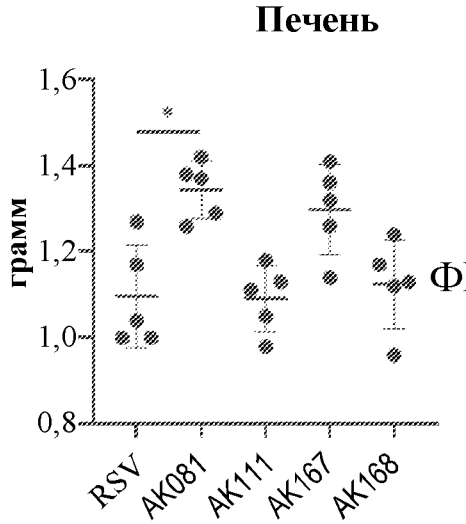

PK в плазме крови общего IgG:
Концентрация IgG в плазме крови (мкг/мл)
100
10
1
0,1
0
2
4
6
Время (день)
Gr. 1: RSV
Gr. 2: AK167
AK167 нерасщепленный
Gr. 3: AK168
AK168 нерасщепленный
Gr. 4: AK209
AK209 нерасщепленный

ФИГ. 24E

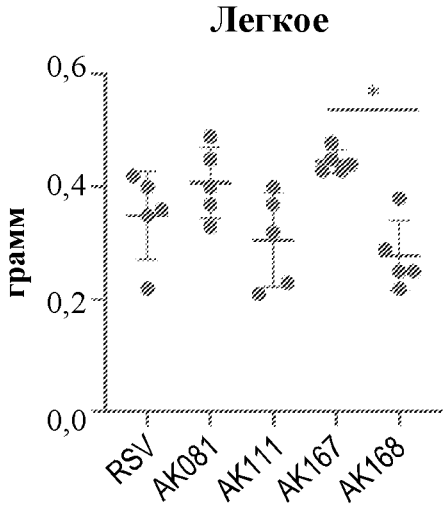
ФИГ. 25A



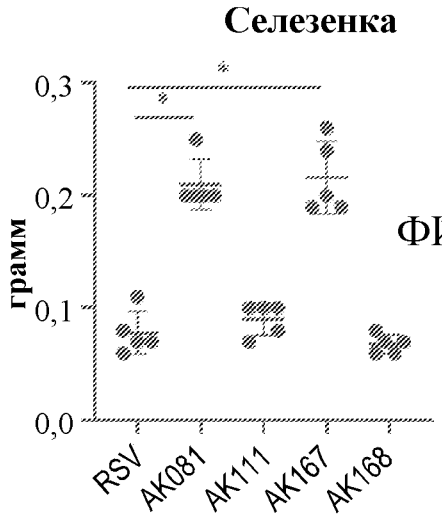
ФИГ. 25B



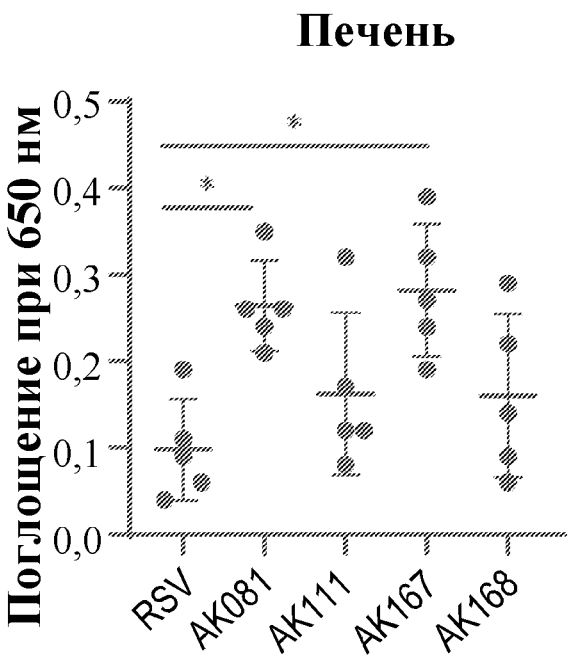
ФИГ. 25C



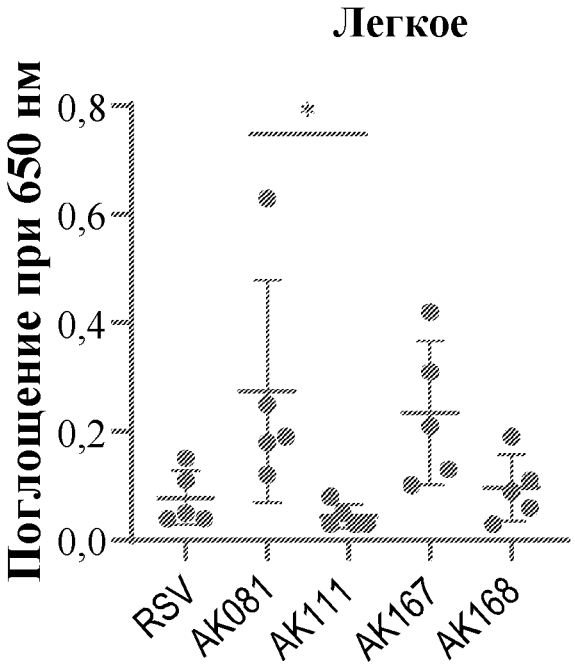
ФИГ. 25D



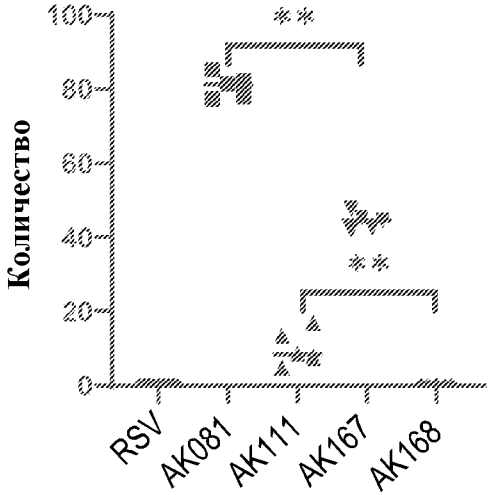
ФИГ. 26А



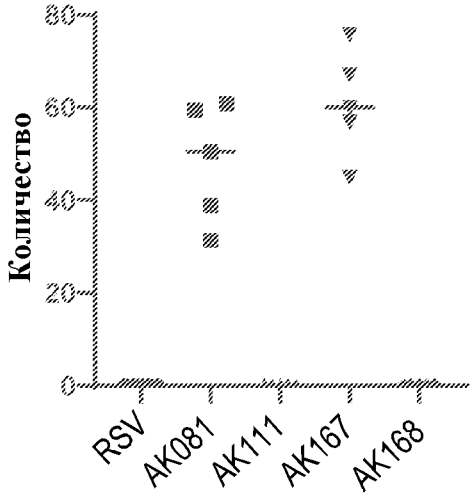
ФИГ. 26В

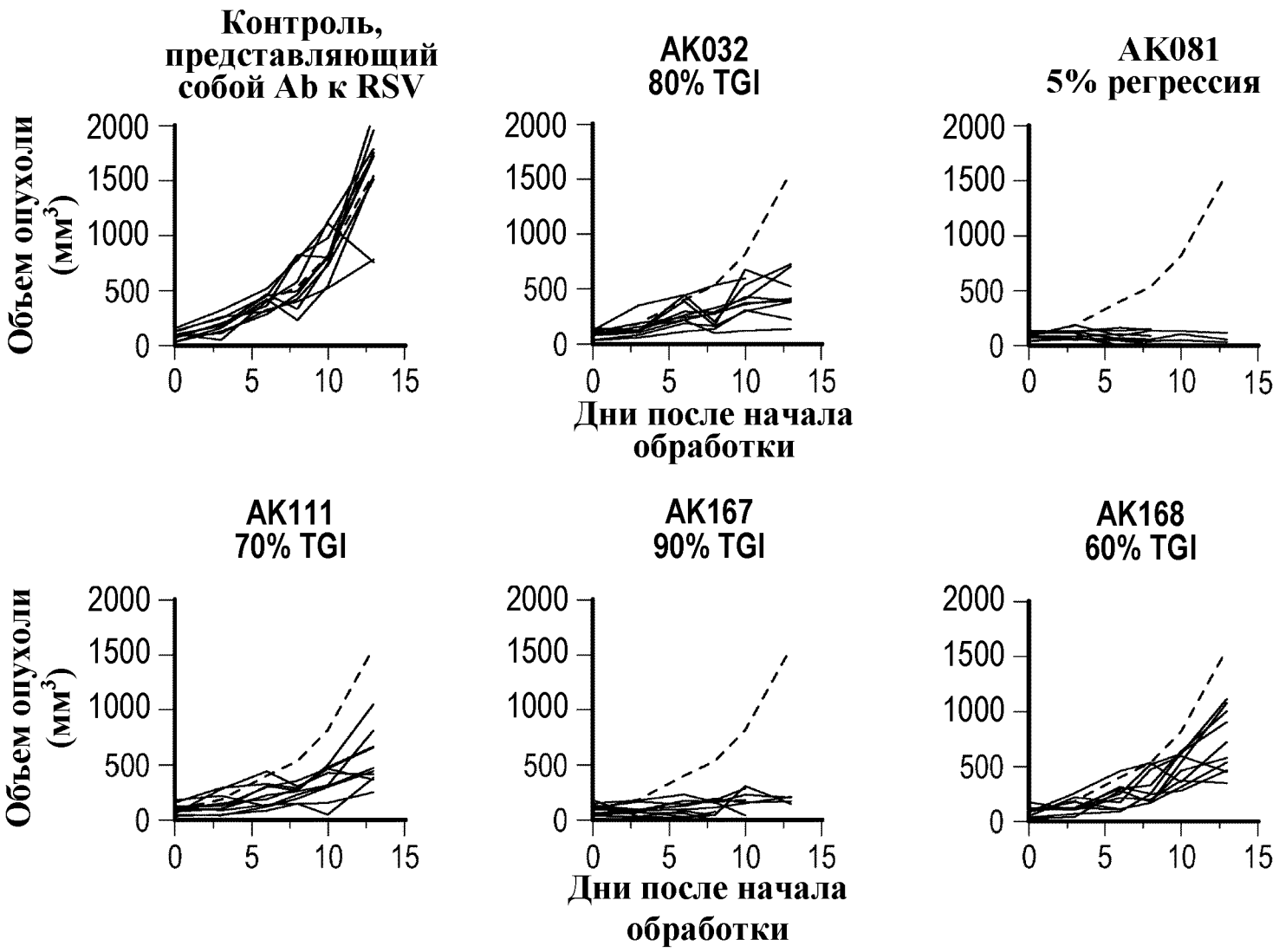


ФИГ. 27A

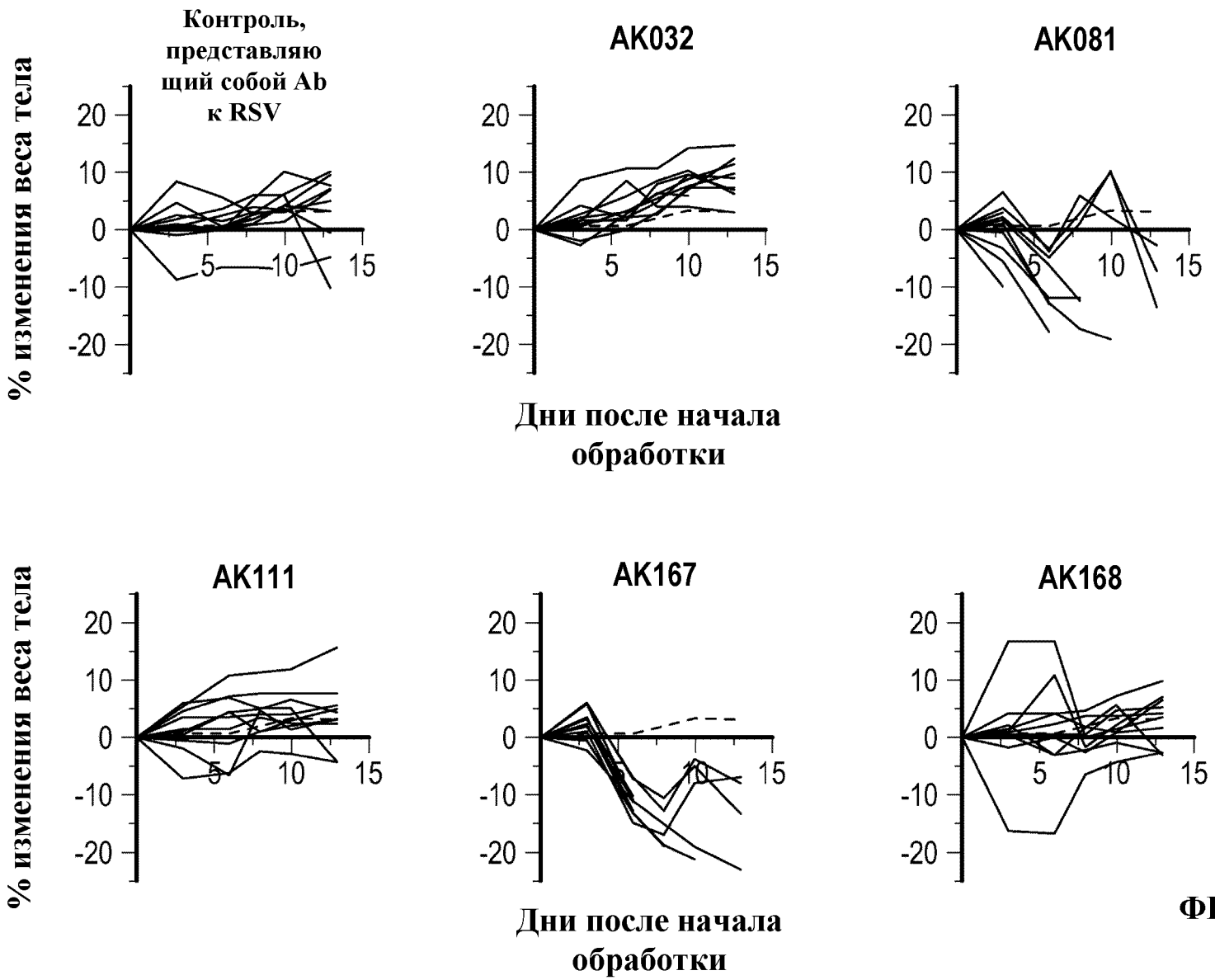


ФИГ. 27B

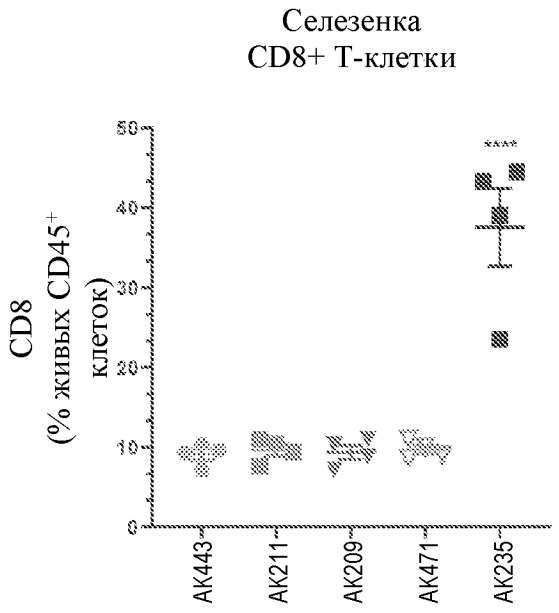



Контроль, представляющий собой Ab к RSV
AK032
80% TGI
AK081
5% регрессия
AK111
70% TGI
AK167
90% TGI
AK168
60% TGI
Объем опухоли (мм3)
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
Дни после начала обработки

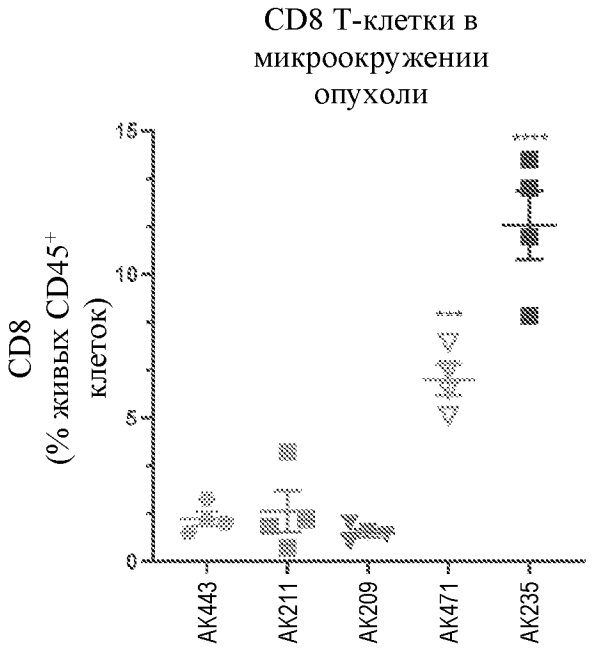
ФИГ. 28А


Контроль, представляющий собой Ab к RSV
AK032
AK081
AK111
AK167
AK168
% изменения веса тела
Дни после начала обработки
20
10
0
-10
-20
5
10
15

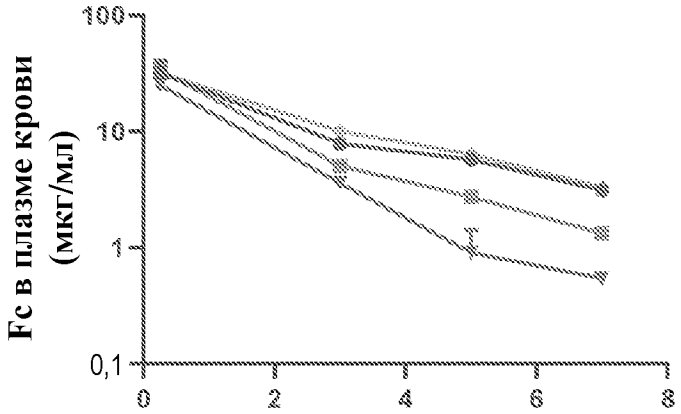
ФИГ. 28B



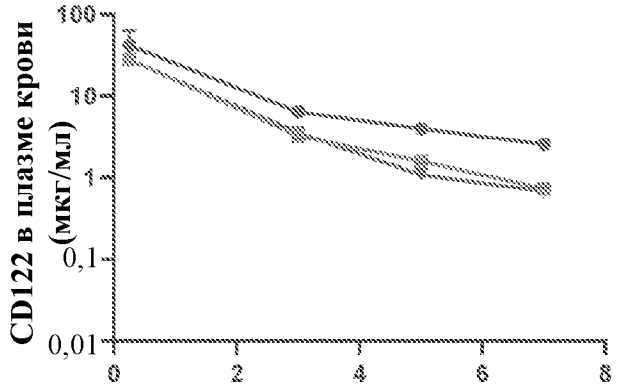
ФИГ. 29А



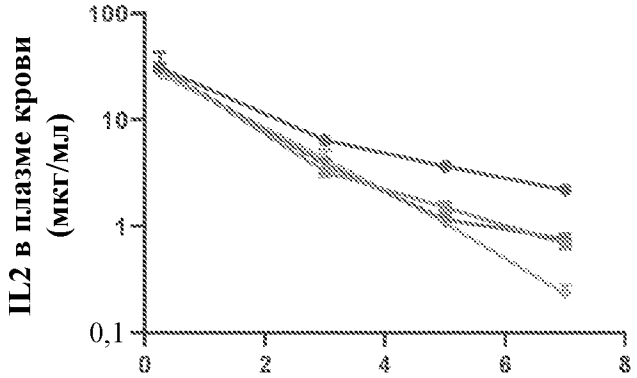
ФИГ. 29В



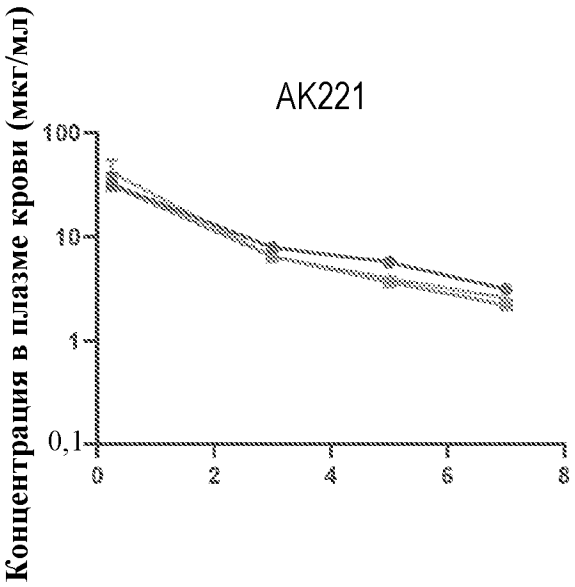
ФИГ. 30A



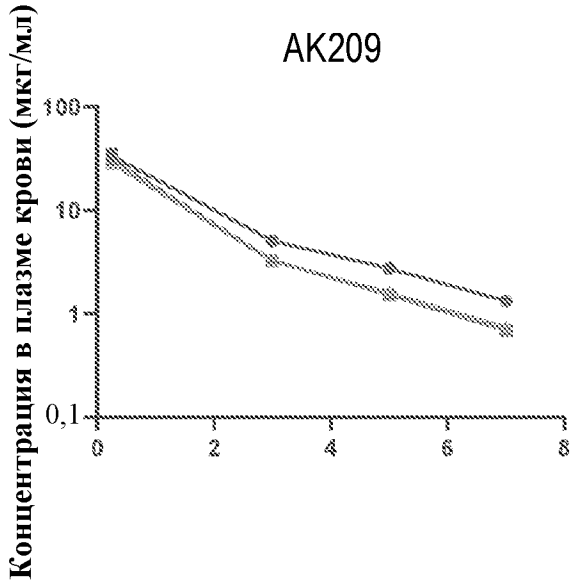
ФИГ. 30B



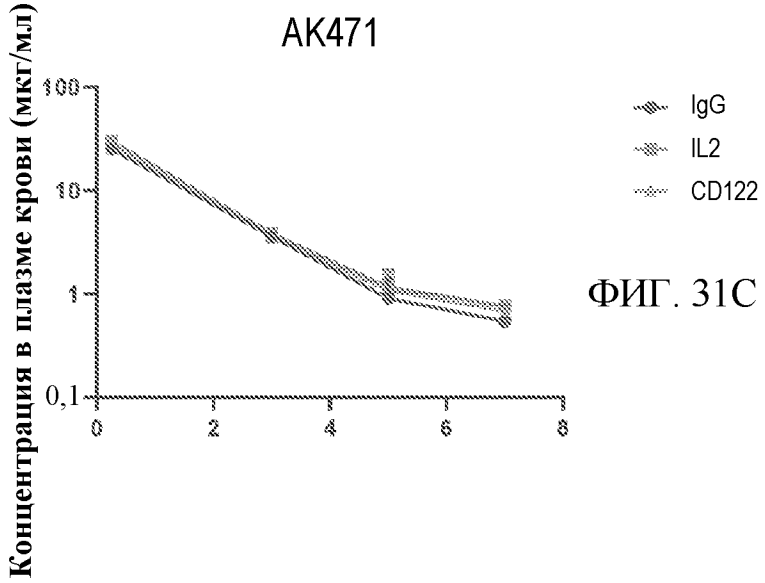
ФИГ. 30C



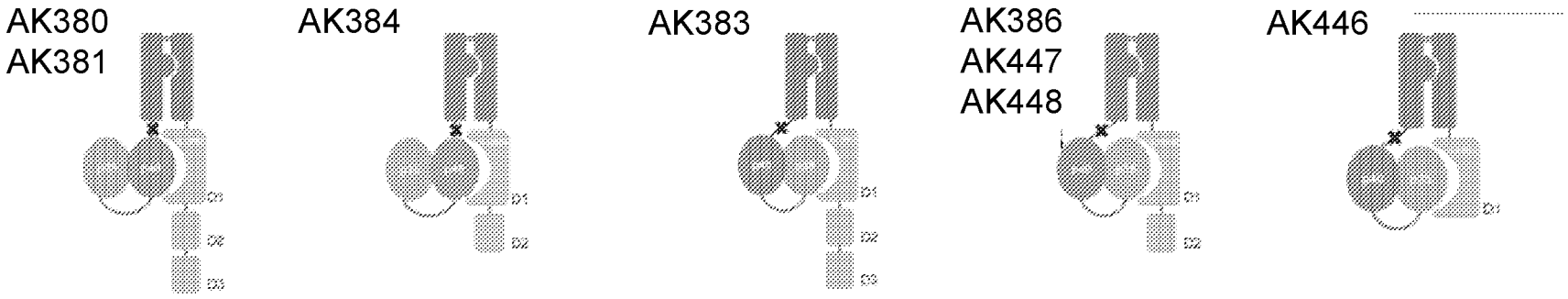
ФИГ. 31A



ФИГ. 31B



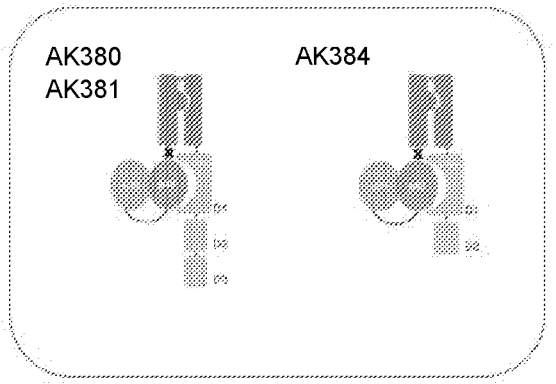
ФИГ. 31C

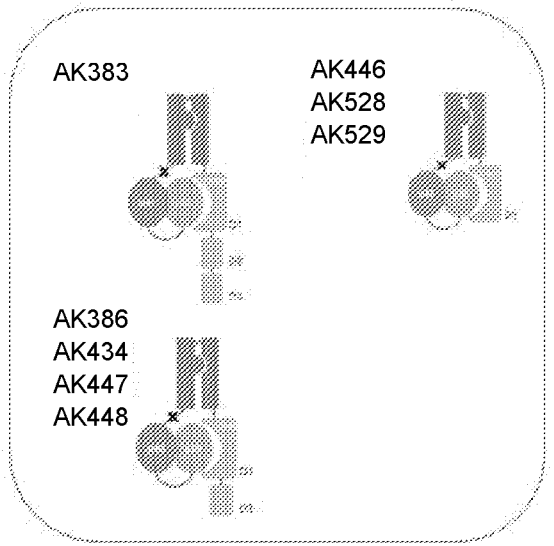


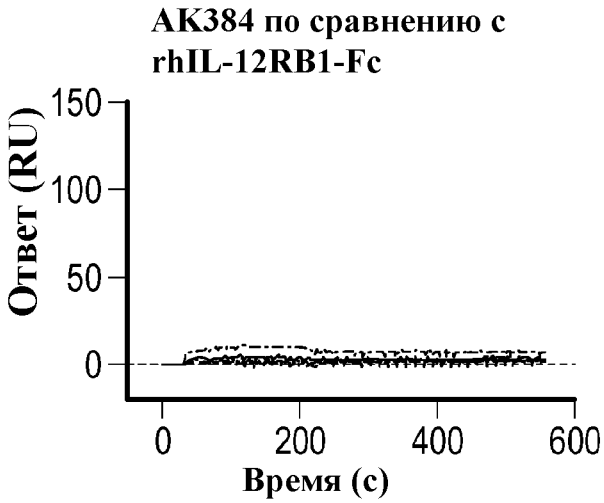
ФИГ. 32

ФИГ. 33A

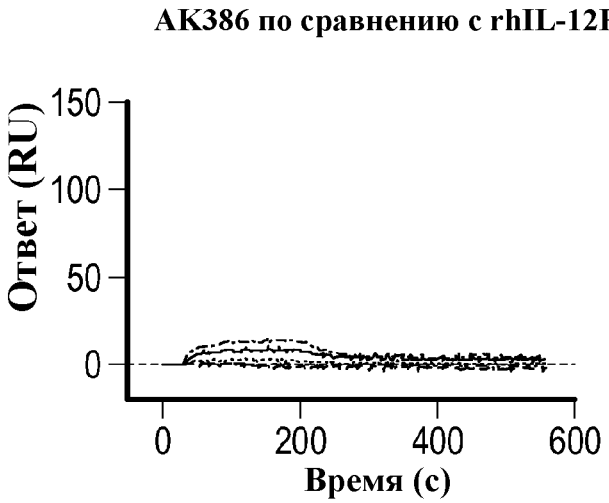
ФИГ. 33B



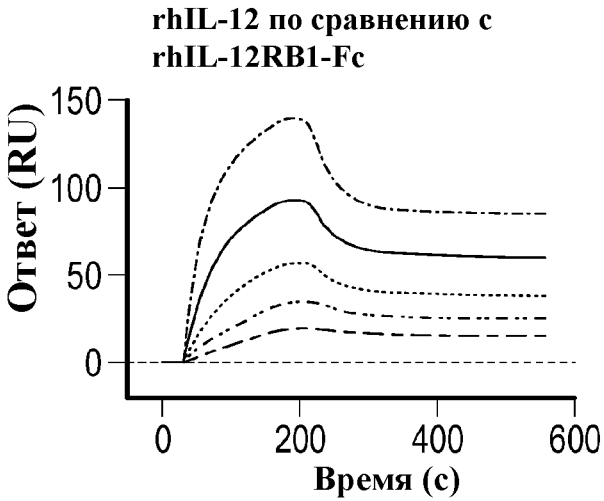




ФИГ. 34A



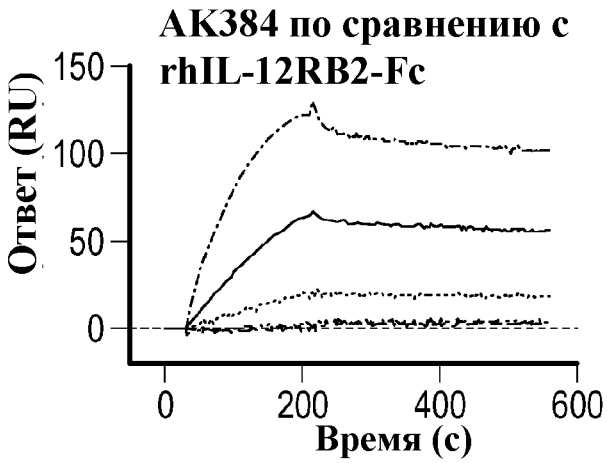
ФИГ. 34B



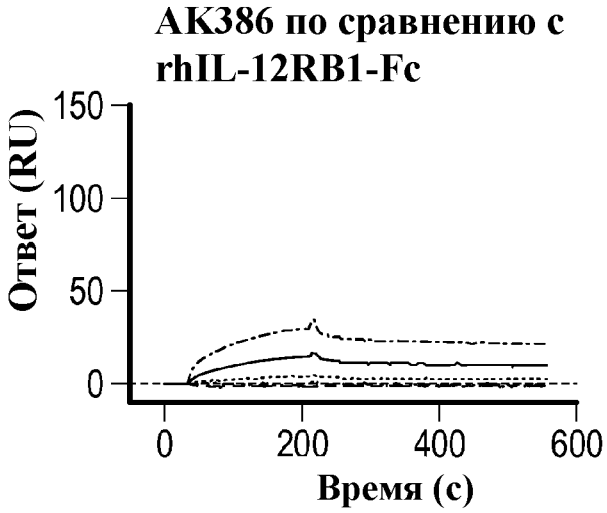
ФИГ. 34C

Образец	ka (1/(M+c))	kd (1/c)	KD	Chi2	U-значение: kd (%)
AK384	ND	ND	ND	ND	ND
AK386	ND	ND	ND	ND	ND
rhIL-12	N/A	N/A	60,1 нМ	N/A	N/A

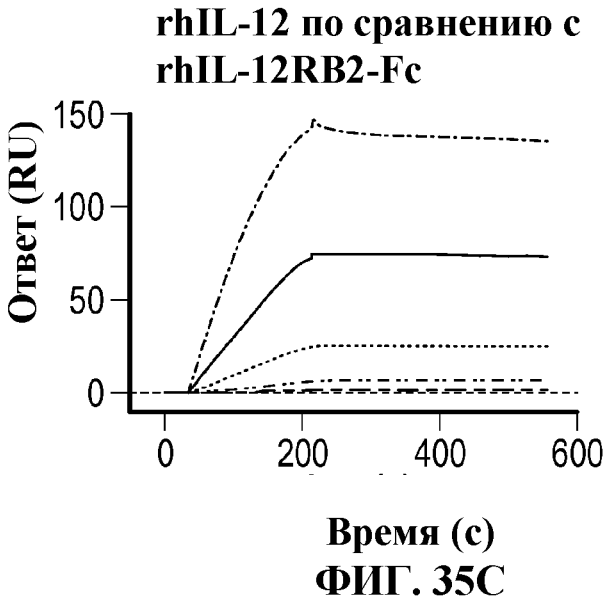
ФИГ. 34D



ФИГ. 35A



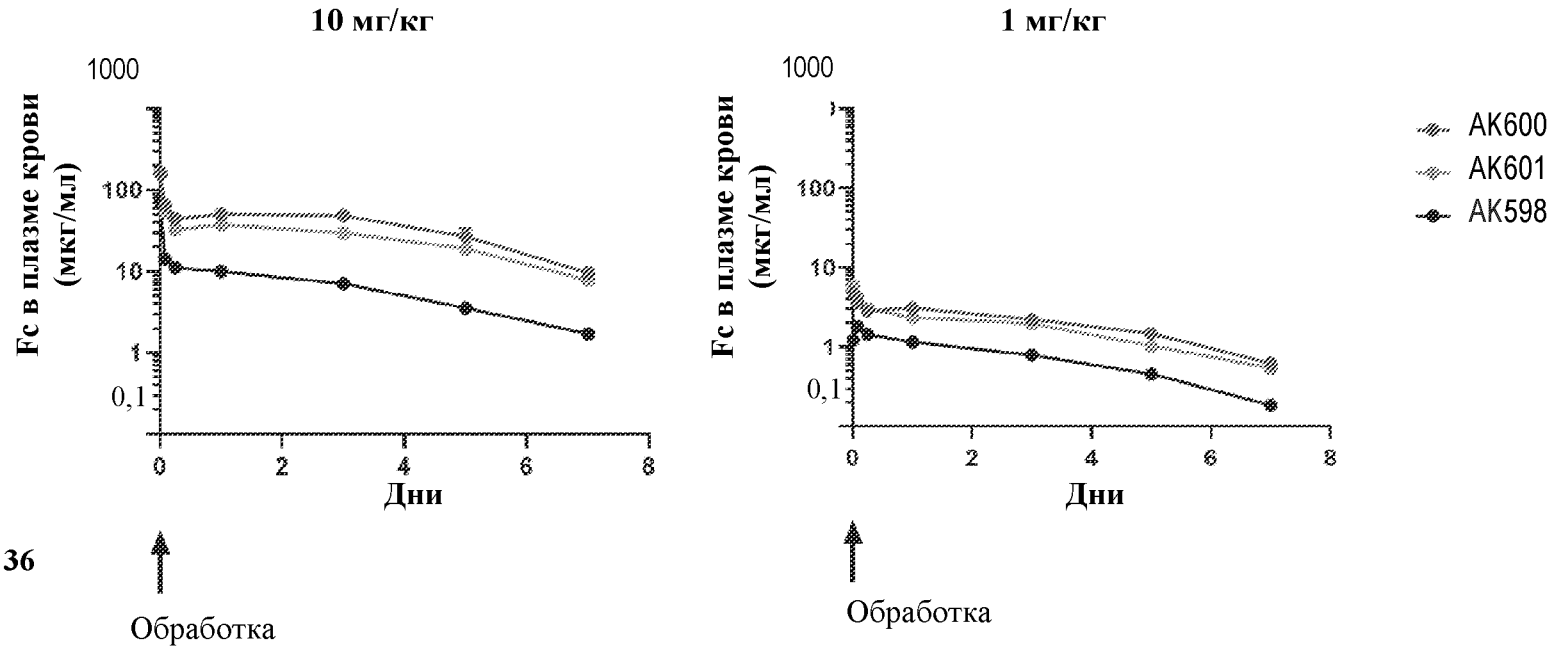
ФИГ. 35B



ФИГ. 35C

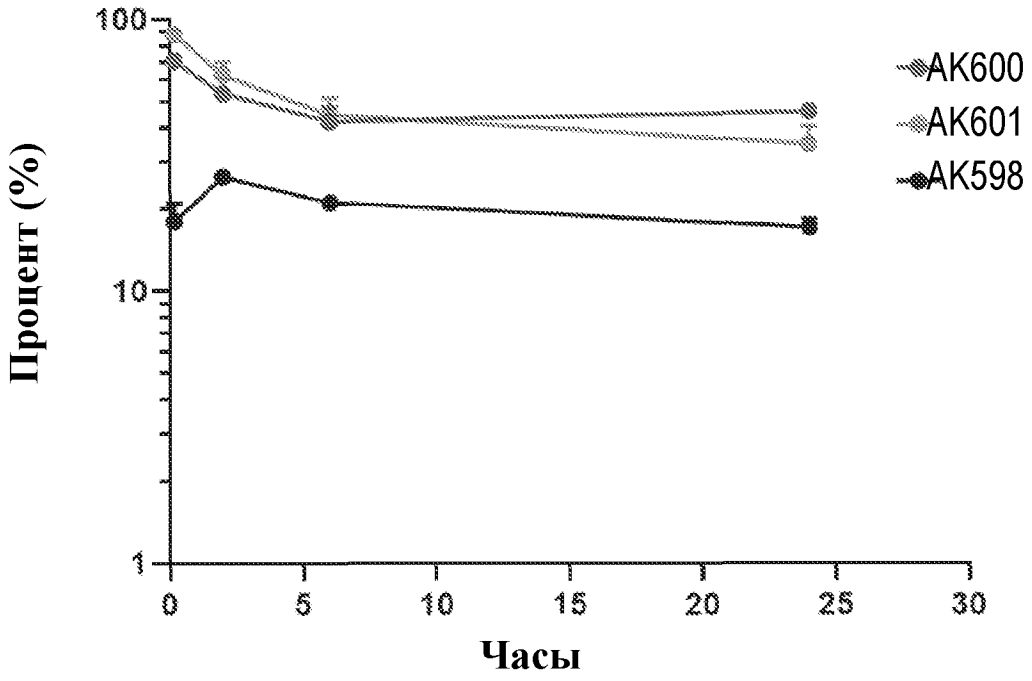
Образец	ka (1/(M+c))	kd (1/s)	KD	Chi2	U-значение: kd (%)
AK384	2,31 e+5	3,92e-4	1,70 нМ	1,21	2,10
AK386	ND	ND	ND	ND	ND
rhIL-12	2,21 e+5	1,37e-4	0,617 нМ	18,42	10,5

ФИГ. 35D

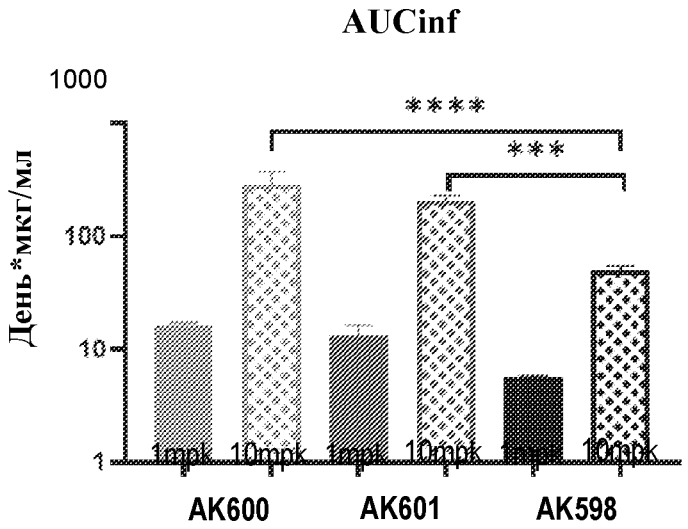

10 мг/кг
1 мг/кг
Fc в плазме крови (мкг/мл)
1000
100
10
1
0,1
0
2
4
6
8
Дни
Обработка
AK600
AK601
AK598

ФИГ. 36

ФИГ. 37



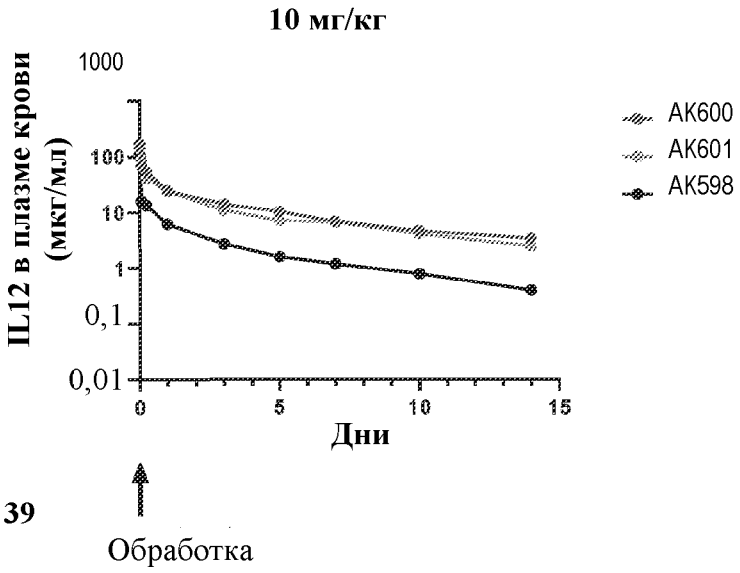
- Мыши C57BL/6
- 20 мкг
- Однократное i.v. введение
- Захват: антитело к IgG человека
- Выявление: антитело к IgG человека

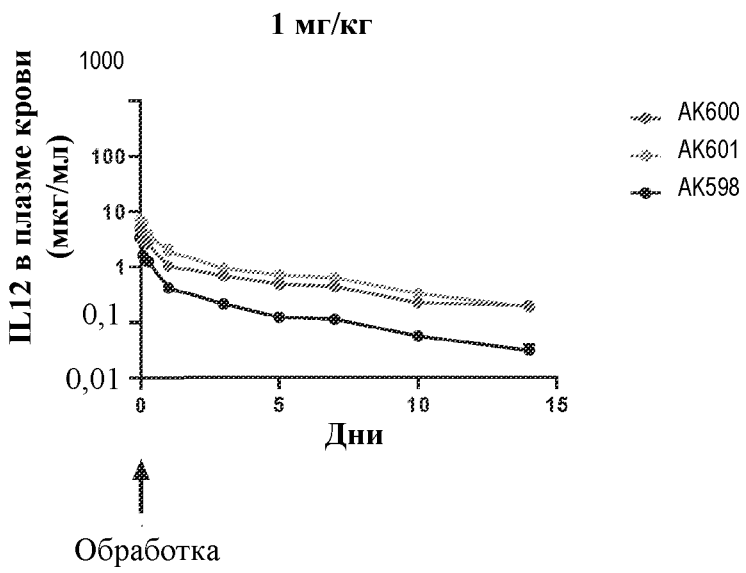


- Никакой разницы в PK-профиле между AK600 и AK601 не наблюдалось.
- Обе AK600 и AK601 характеризовались более высоким воздействием лекарственного средства по Cmax и AUC чем AK598.
- AK600 и AK601 характеризовались периодом полужизни, сходным с периодом полужизни AK598.

AK600									
1 мг/кг					10 мг/кг				
Период полужизни (день)	Cmax (мкг/мл)	Tmax (день)	AUClast (день*мкг/мл)	AUCINF_obs (день*мкг/мл)	Период полужизни (день)	Cmax (мкг/мл)	Tmax (день)	AUClast (день*мкг/мл)	AUCINF_obs (день*мкг/мл)
2,486	4,767	0,007	14,03	16,276	1,714	166,486	0,007	261,314	285,263
AK601									
1 мг/кг					10 мг/кг				
Период полужизни (день)	Cmax (мкг/мл)	Tmax (день)	AUClast (день*мкг/мл)	AUCINF_obs (день*мкг/мл)	Период полужизни (день)	Cmax (мкг/мл)	Tmax (день)	AUClast (день*мкг/мл)	AUCINF_obs (день*мкг/мл)
2,031	5,994	0,007	11,692	13,291	2,199	154,814	0,007	181,3	206,2
AK598									
1 мг/кг					10 мг/кг				
Период полужизни (день)	Cmax (мкг/мл)	Tmax (день)	AUClast (день*мкг/мл)	AUCINF_obs (день*мкг/мл)	Период полужизни (день)	Cmax (мкг/мл)	Tmax (день)	AUClast (день*мкг/мл)	AUCINF_obs (день*мкг/мл)
2,013	1,793	0,083	5,097	5,639	1,954	73,45	0,007	45,573	50,403

ФИГ. 38

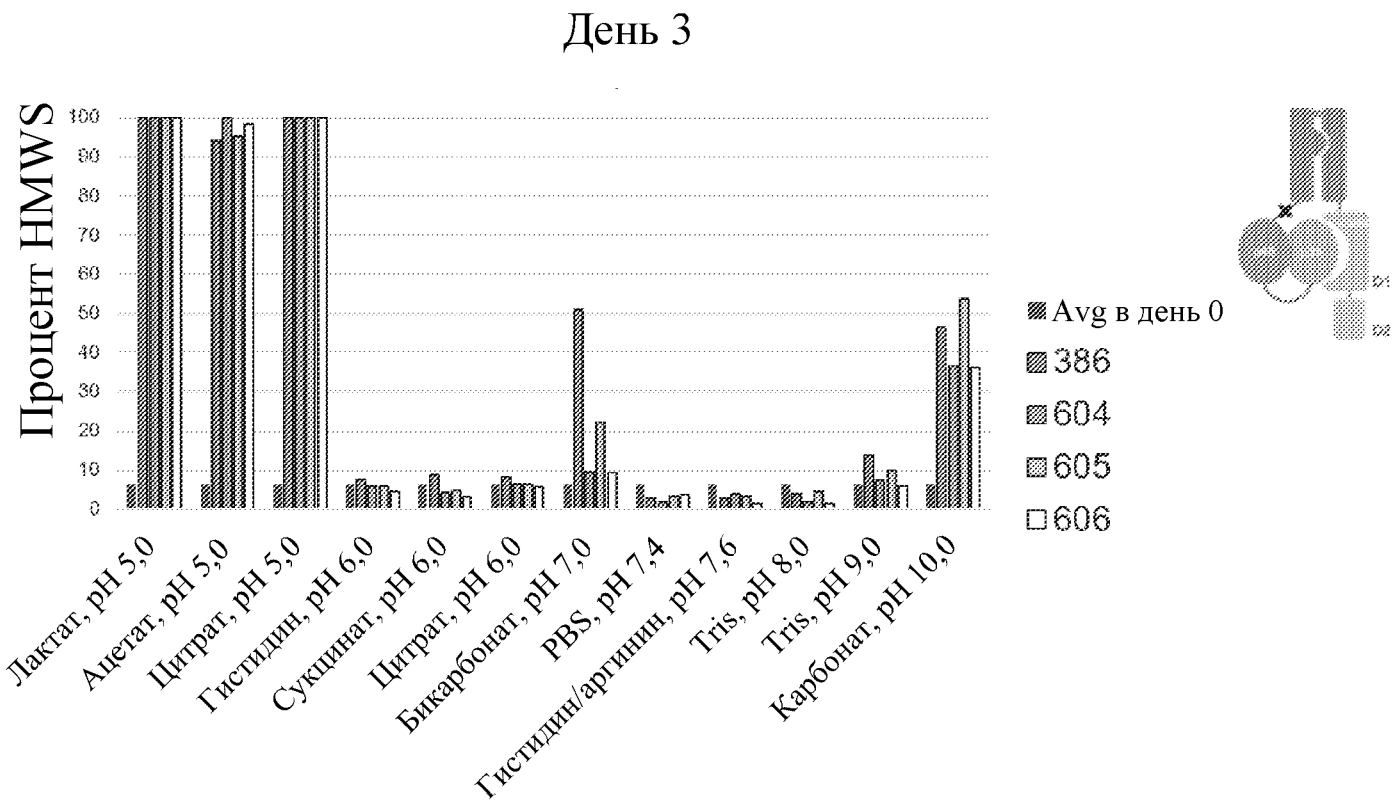

10 мг/кг
IL12 в плазме крови (мкг/мл)
1000
100
10
1
0,1
0,01
0
5
10
15
Дни
AK600
AK601
AK598
Обработка


1 мг/кг
IL12 в плазме крови (мкг/мл)
1000
100
10
1
0,1
0,01
0
5
10
15
Дни
AK600
AK601
AK598
Обработка

ФИГ. 39

AK600											
1 мг/кг						10 мг/кг					
Период полужизни (день)	**Cmax (мкг/мл)**	**AUClast (день*мкг/мл)**	**AUCINF_obs (день*мкг/мл)**	**Cl_obs (мл/день/кг)**	**Vz_obs (мл/кг)**	**Период полужизни (день)**	**Cmax (мкг/мл)**	**AUClast (день*мкг/мл)**	**AUCINF_obs (день*мкг/мл)**	**Cl_obs (мл/день/кг)**	**Vz_obs (мл/кг)**
5,651	4,925	7,021	9,359	107,083	871,266	6,052	159,773	160,198	190,176	53,938	474,291
AK601											
1 мг/кг						**10 мг/кг**					
Период полужизни (день)	**Cmax (мкг/мл)**	**AUClast (день*мкг/мл)**	**AUCINF_obs (день*мкг/мл)**	**Cl_obs (мл/день/кг)**	**Vz_obs (мл/кг)**	**Период полужизни (день)**	**Cmax (мкг/мл)**	**AUClast (день*мкг/мл)**	**AUCINF_obs (день*мкг/мл)**	**Cl_obs (мл/день/кг)**	**Vz_obs (мл/кг)**
4,168	7,193	11,542	12,653	82,775	505,09	5,455	147,612	138,749	158,338	63,786	505,923
AK598											
1 мг/кг						**10 мг/кг**					
Период полужизни (день)	**Cmax (мкг/мл)**	**AUClast (день*мкг/мл)**	**AUCINF_obs (день*мкг/мл)**	**Cl_obs (мл/день/кг)**	**Vz_obs (мл/кг)**	**Период полужизни (день)**	**Cmax (мкг/мл)**	**AUClast (день*мкг/мл)**	**AUCINF_obs (день*мкг/мл)**	**Cl_obs (мл/день/кг)**	**Vz_obs (мл/кг)**
4,136	3,368	2,59	2,784	363,913	2123,945	4,7	107,585	34,501	37,38	268,073	1818,55

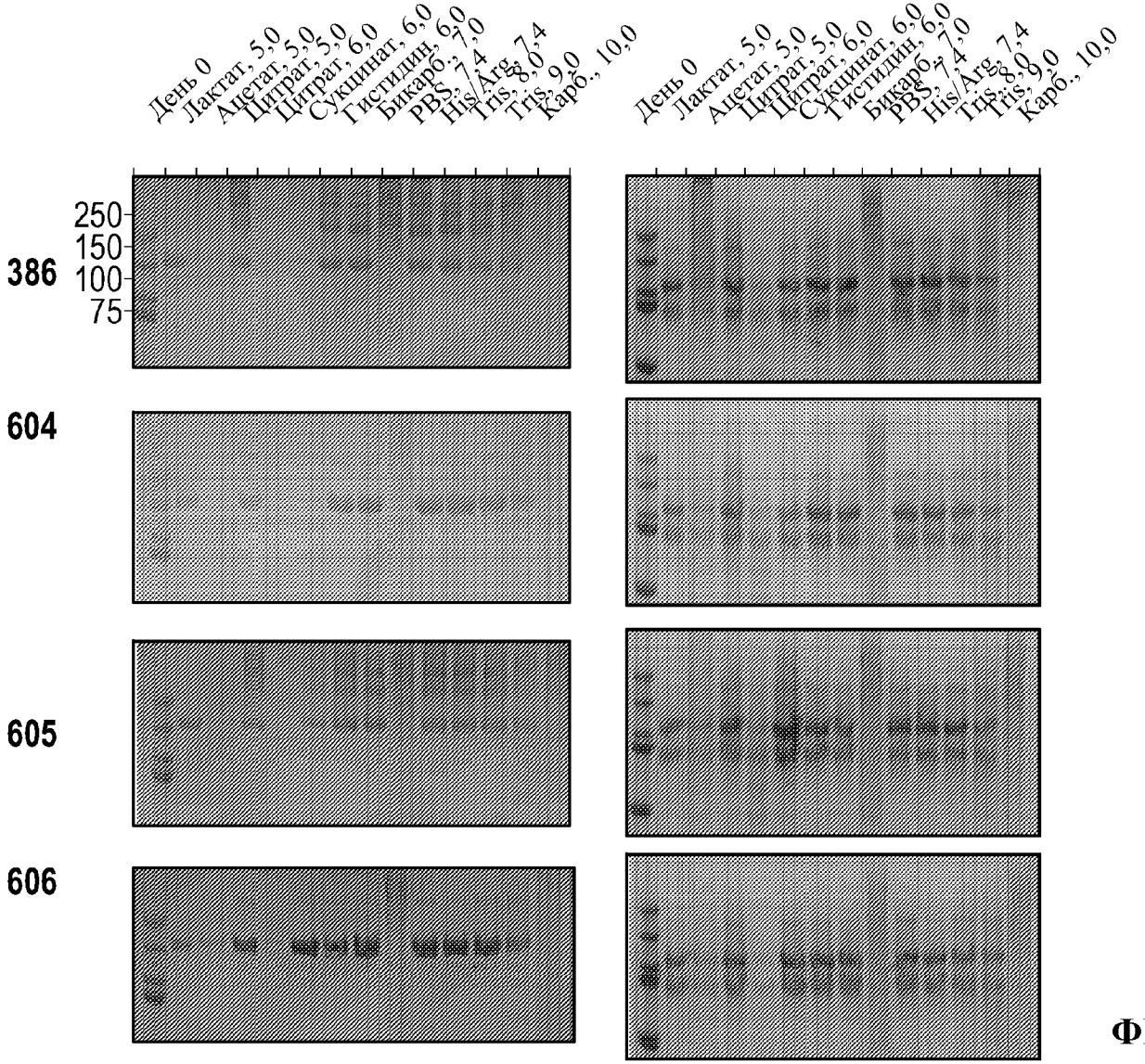
ФИГ. 40


День 3
Процент HMWS
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Лактат, pH 5,0
Ацетат, pH 5,0
Цитрат, pH 5,0
Гистидин, pH 6,0
Сукцинат, pH 6,0
Цитрат, pH 6,0
Бикарбонат, pH 7,0
PBS, pH 7,4
Гистидин/аргинин, pH 7,6
Tris, pH 8,0
Tris, pH 9,0
Карбонат, pH 10,0
Avg в день 0
386
604
605
606

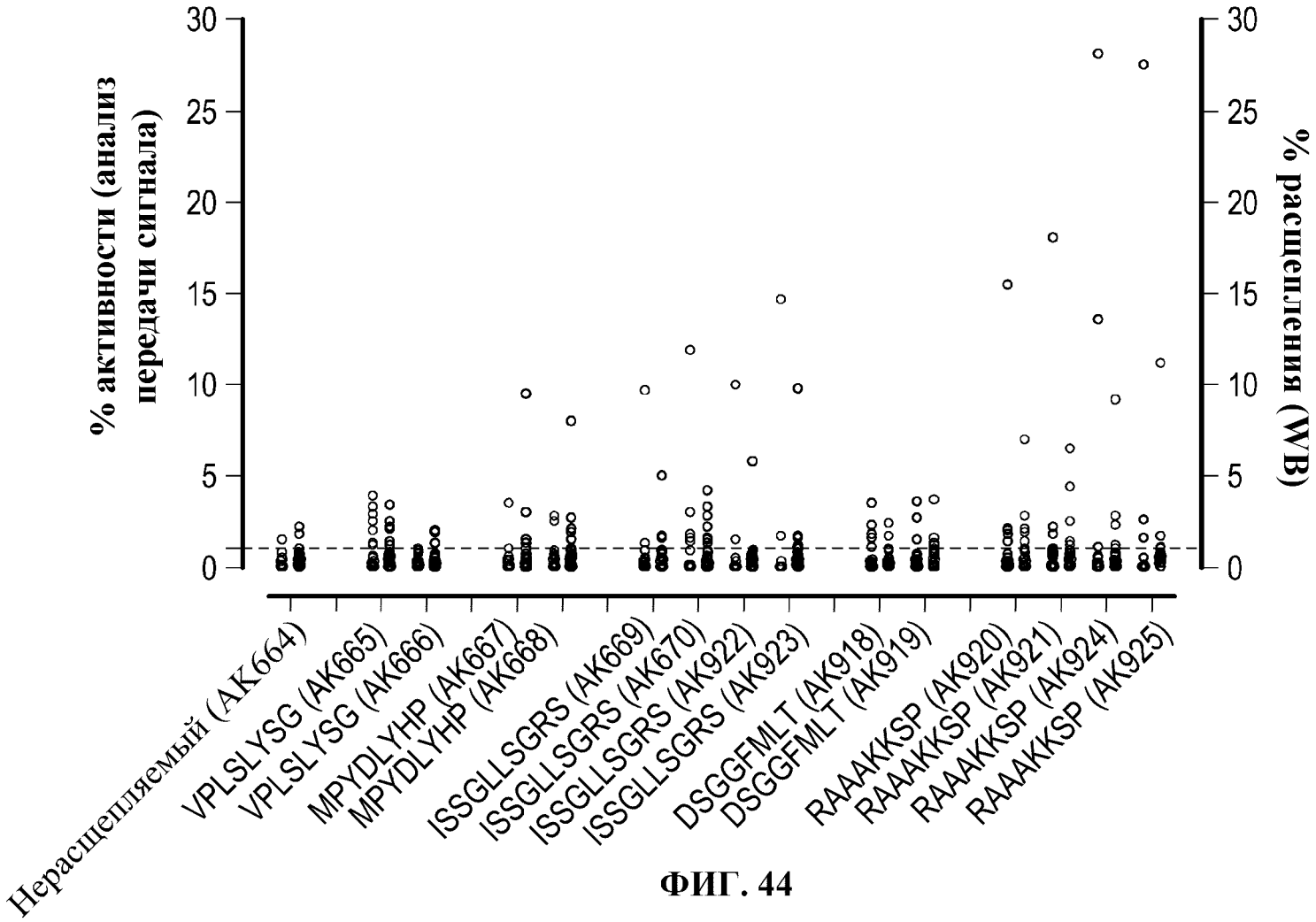
ФИГ. 41

День 12
Процент HMWS
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Лактат, pH 5,0
Ацетат, pH 5,0
Цитрат, pH 5,0
Гистидин, pH 6,0
Сукцинат, pH 6,0
Цитрат, pH 6,0
Бикарбонат, pH 7,0
PBS, pH 7,4
Гистидин/аргинин, pH 7,6
Tris, pH 8,0
Tris, pH 9,0
Карбонат, pH 10,0
386
604
605
606

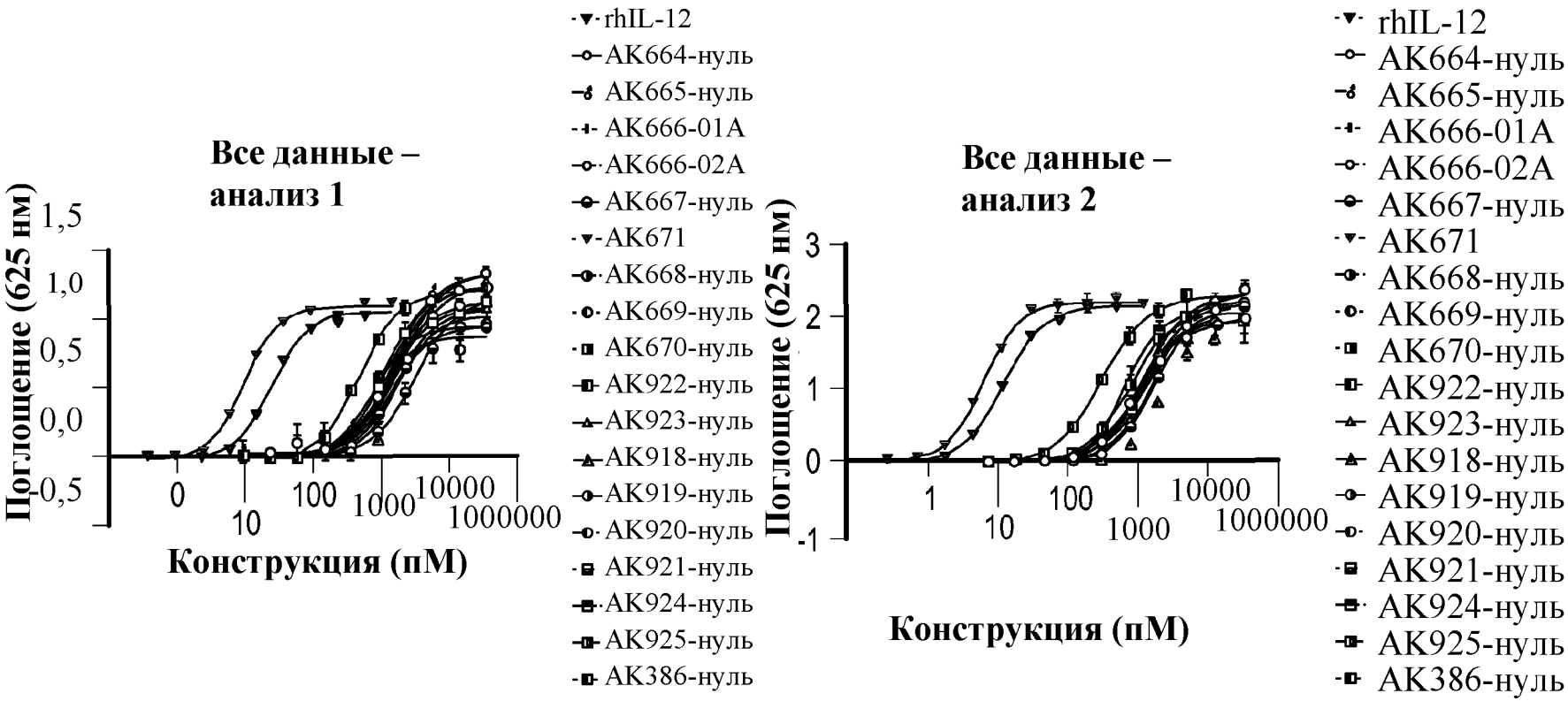
ФИГ. 42


День 0
Лактат, 5,0
Ацетат, 5,0
Цитрат, 5,0
Цитрат, 6,0
Сукцинат, 6,0
Гистидин, 6,0
Бикарб., 7,0
PBS, 7,4
His/Arg, 7,4
Tris, 8,0
Tris, 9,0
Карб., 10,0
250
150
100
75
386
604
605
606

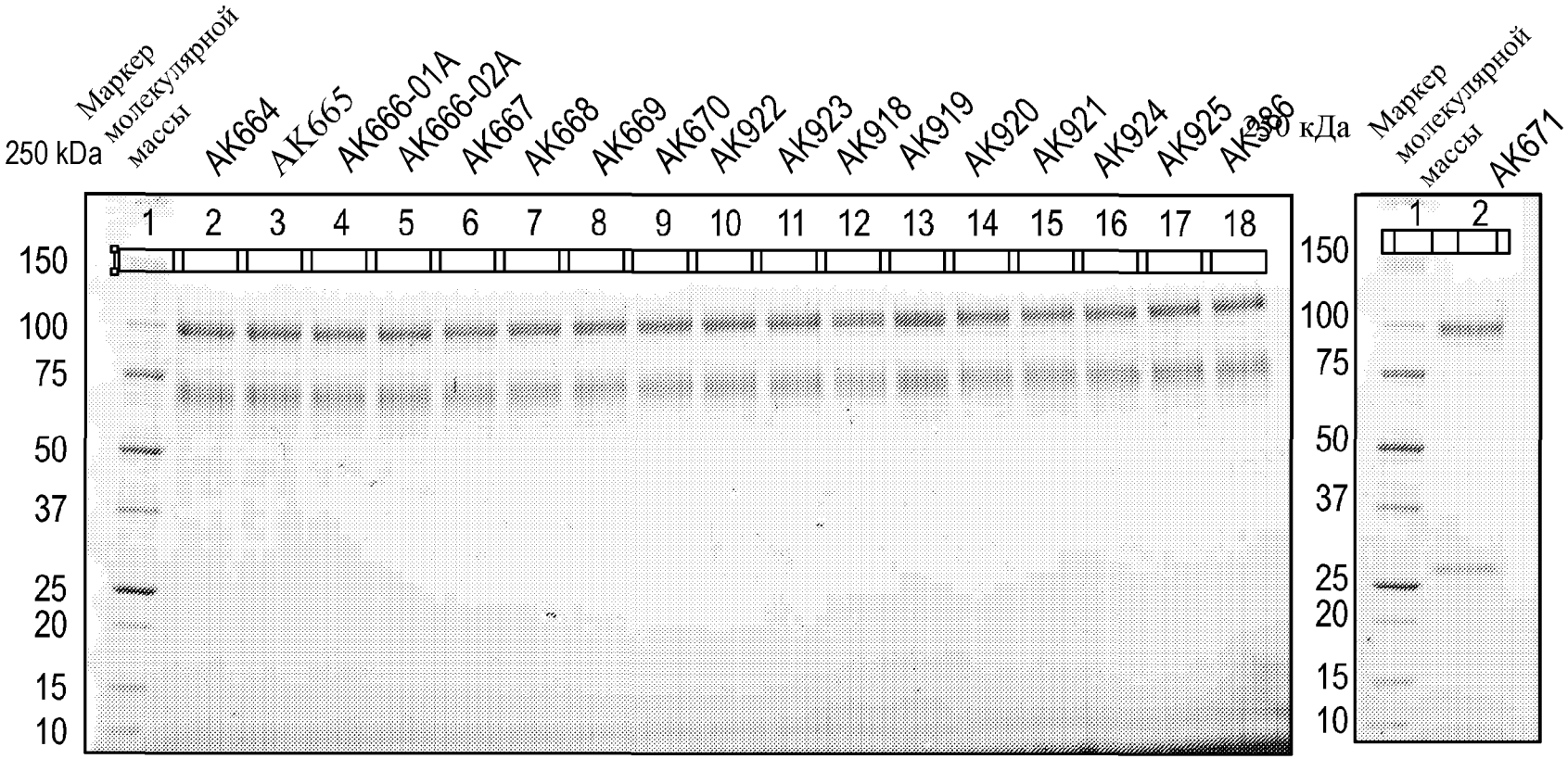
ФИГ. 43


% активности (анализ передачи сигнала)
% расщепления (WB)
30
25
20
15
10
5
0
Нерасщепляемый (AK664)
VPLSLYSG (AK665)
VPLSLYSG (AK666)
MPYDLYHP (AK667)
MPYDLYHP (AK668)
ISSGLLSGRS (AK669)
ISSGLLSGRS (AK670)
ISSGLLSGRS (AK922)
ISSGLLSGRS (AK923)
DSGGFMLT (AK918)
DSGGFMLT (AK919)
RAAAKKSP (AK920)
RAAAKKSP (AK921)
RAAAKKSP (AK924)
RAAAKKSP (AK925)

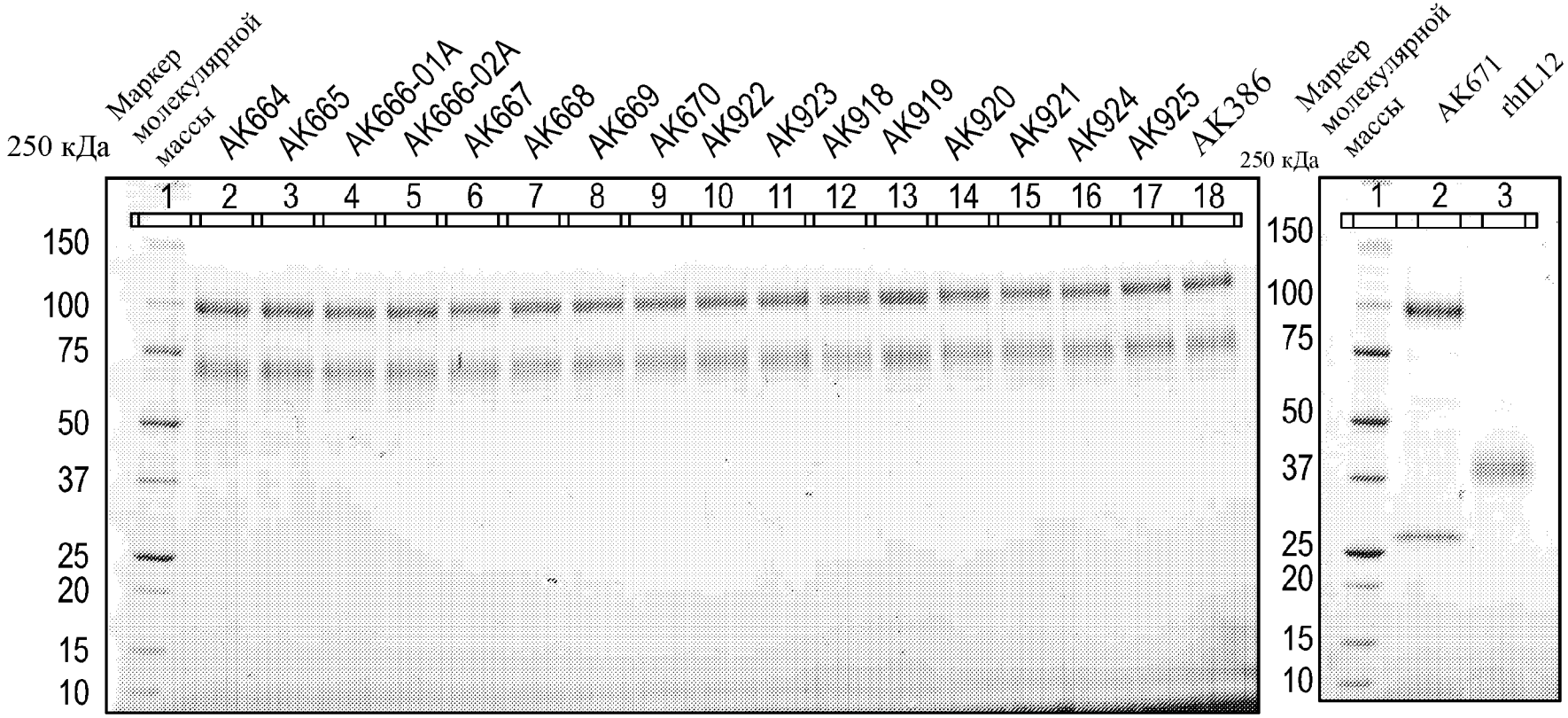
ФИГ. 44


Все данные – анализ 1
Поглощение (625 нм)
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
0
10
100
1000
10000
1000000
Конструкция (пМ)
rhIL-12
AK664-нуль
AK665-нуль
AK666-01A
AK666-02A
AK667-нуль
AK671
AK668-нуль
AK669-нуль
AK670-нуль
AK922-нуль
AK923-нуль
AK918-нуль
AK919-нуль
AK920-нуль
AK921-нуль
AK924-нуль
AK925-нуль
AK386-нуль
Все данные – анализ 2
Поглощение (625 нм)
3
2
1
0
-1
1
10
100
1000
10000
1000000
Конструкция (пМ)
rhIL-12
AK664-нуль
AK665-нуль
AK666-01A
AK666-02A
AK667-нуль
AK671
AK668-нуль
AK669-нуль
AK670-нуль
AK922-нуль
AK923-нуль
AK918-нуль
AK919-нуль
AK920-нуль
AK921-нуль
AK924-нуль
AK925-нуль
AK386-нуль

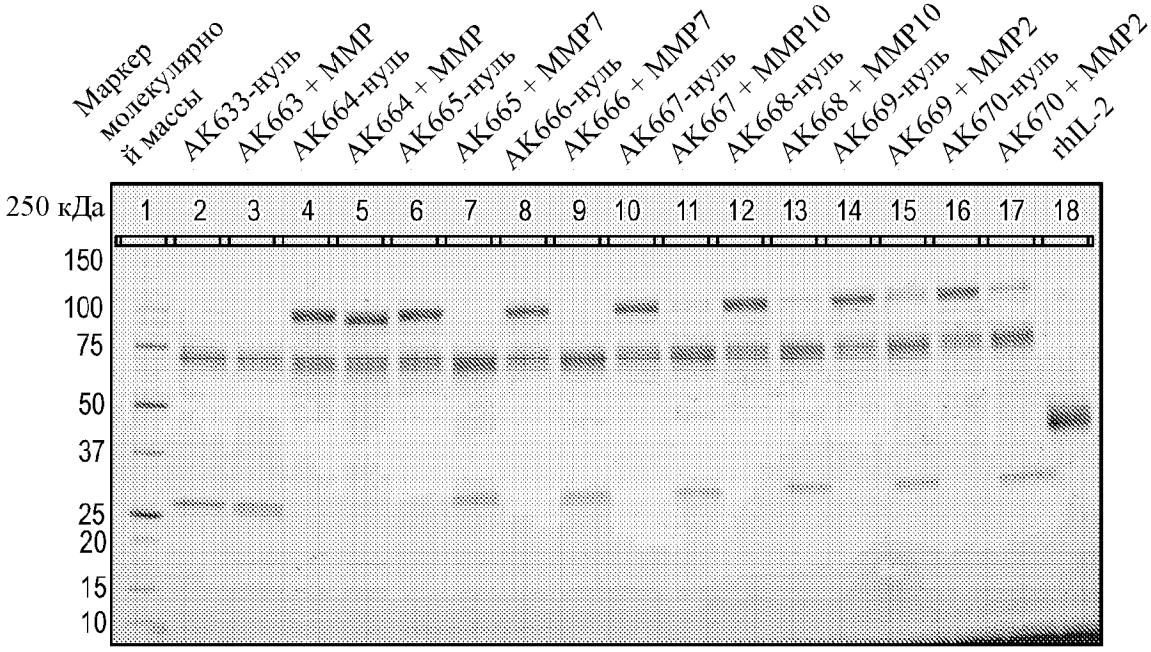
ФИГ. 45


Маркер молекулярной массы
250 kDa
АК664
АК665
АК666-01А
АК666-02А
АК667
АК668
АК669
АК670
АК922
АК923
АК918
АК919
АК920
АК921
АК924
АК925
АК926
150 кДа
Маркер молекулярной массы
АК671
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
150
100
75
50
37
25
20
15
10
1 2
150
100
75
50
37
25
20
15
10

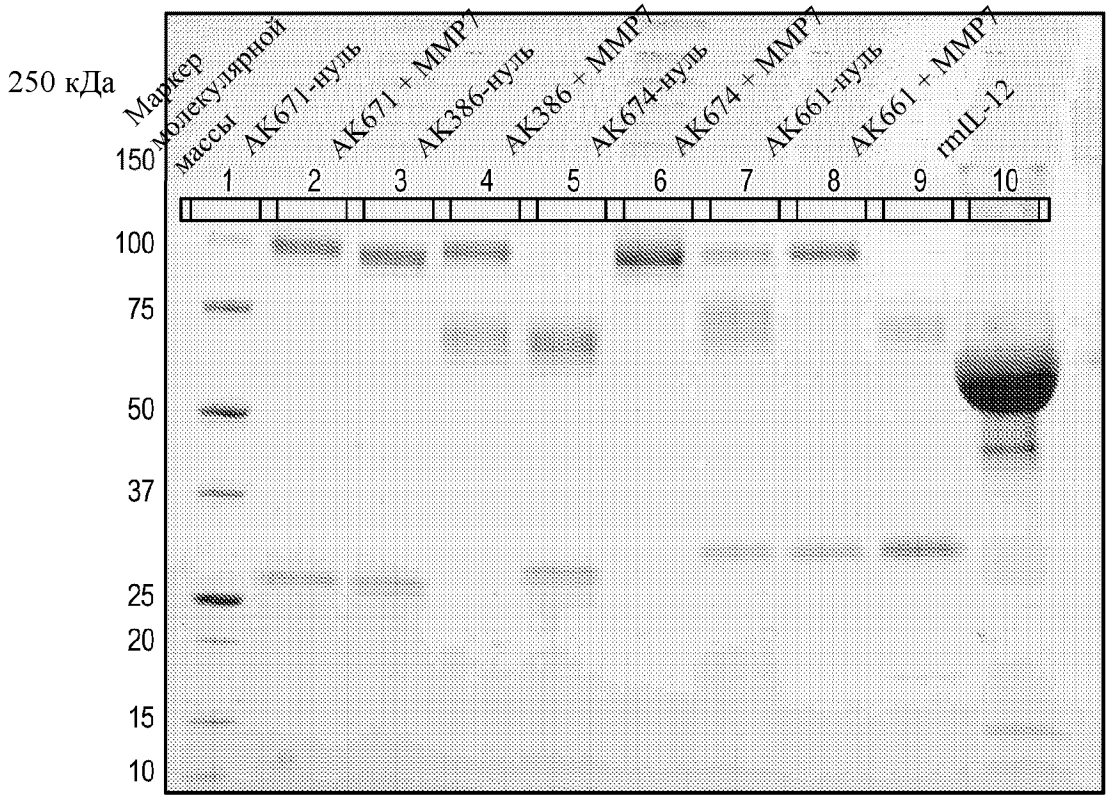
ФИГ. 46А


250 кДа
Маркер молекулярной массы
АК664
АК665
АК666-01А
АК666-02А
АК667
АК668
АК669
АК670
АК922
АК923
АК918
АК919
АК920
АК921
АК924
АК925
АК386
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
150
100
75
50
37
25
20
15
10
250 кДа
Маркер молекулярной массы
АК671
rhIL12
1 2 3
150
100
75
50
37
25
20
15
10

ФИГ. 46В

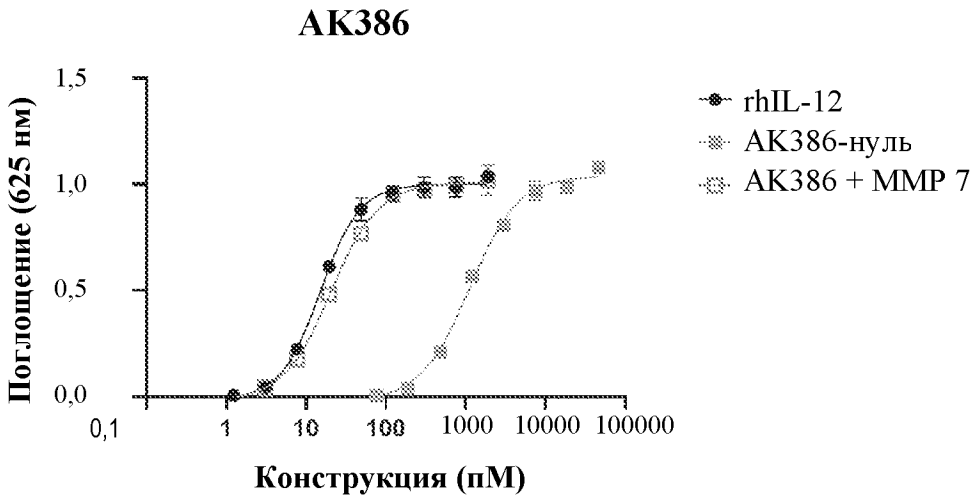


ФИГ. 47А



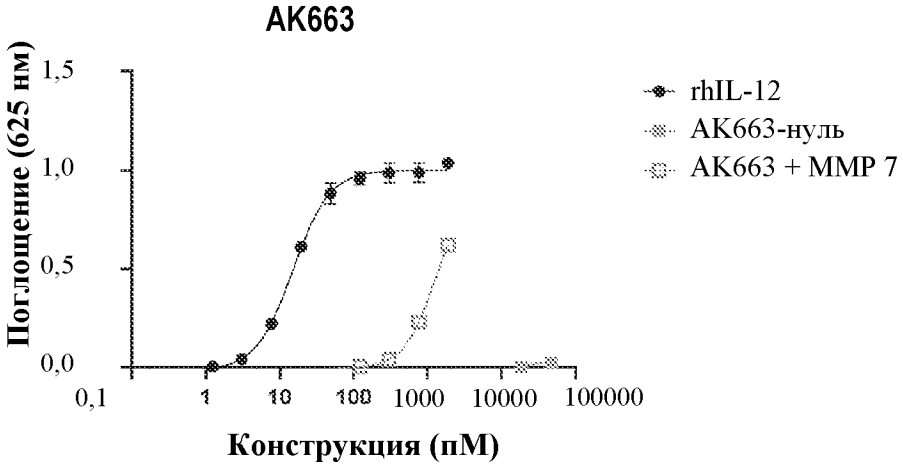
ФИГ. 47В

ФИГ. 48A



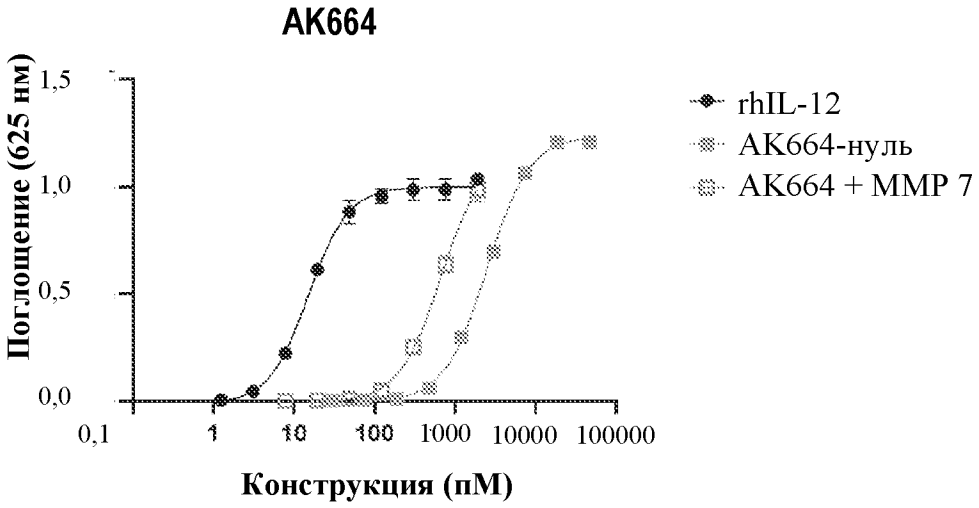
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	15,13	
AK386-нуль	1123	74,2
AK386 + MMP 7	20,64	1,4

ФИГ. 48B



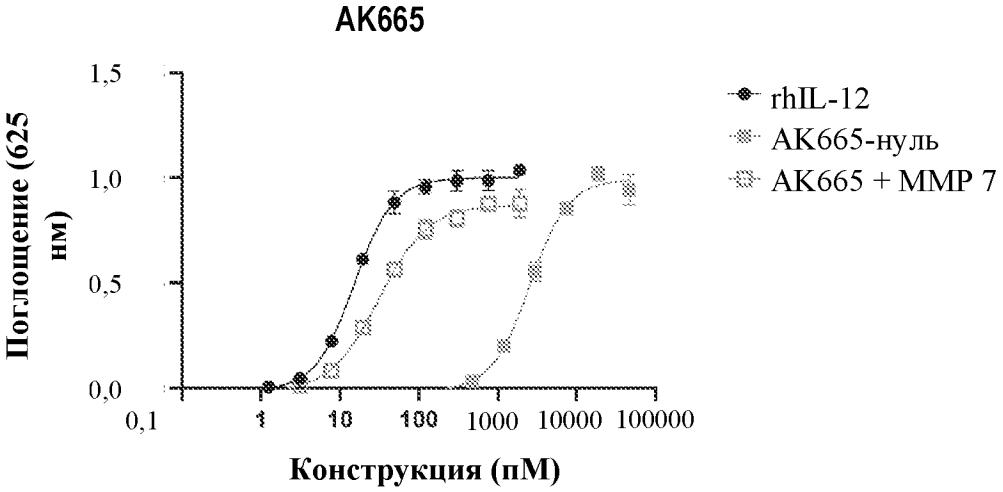
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	15,13	
AK663-нуль	~21100	N/A
AK663 + MMP 7	1240	82,0

ФИГ. 48C



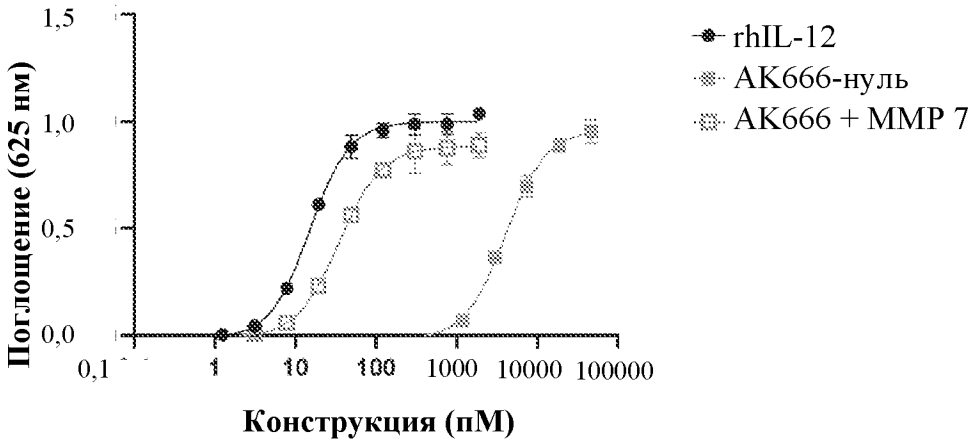
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	15,13	
AK664-нуль	2485	164,2
AK664 + MMP 7	667,4	44,1

ФИГ. 48D



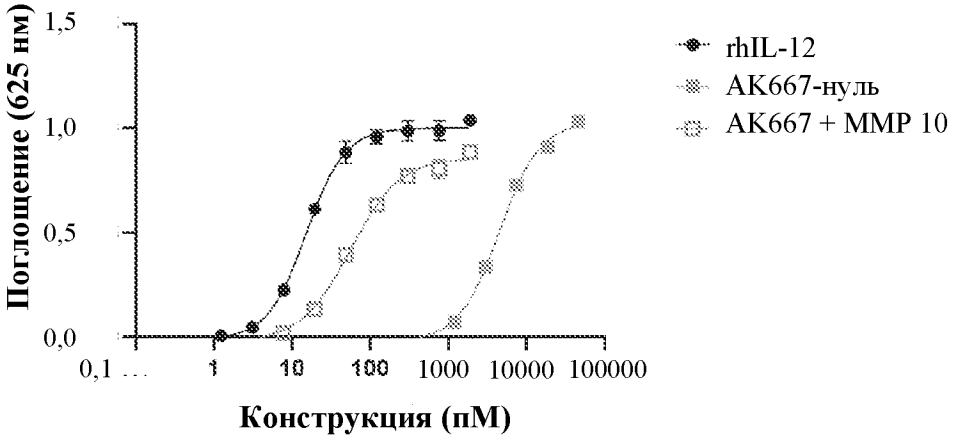
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	15,13	
AK665-нуль	2555	168,9
AK665 + MMP 7	31,21	2,1

ФИГ. 48E



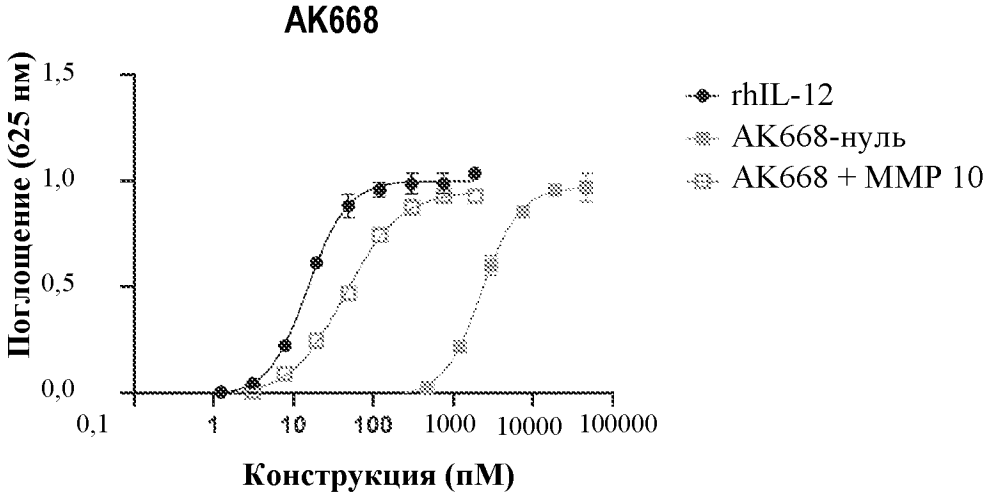
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	15,13	
AK666-нуль	4061	268,4
AK666 + MMP 7	35,09	2,3

ФИГ. 48F



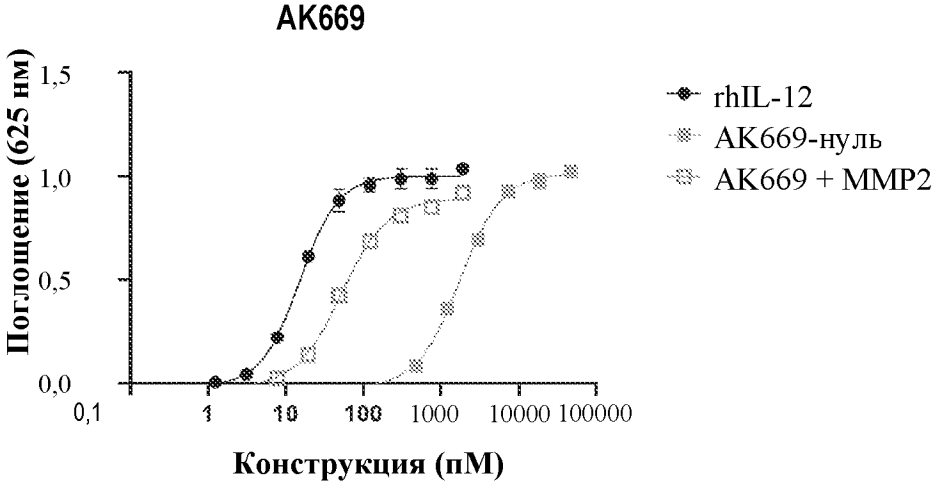
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	15,13	
AK667-нуль	4497	297,2
AK667 + MMP 10	55,77	3,7

ФИГ. 48G



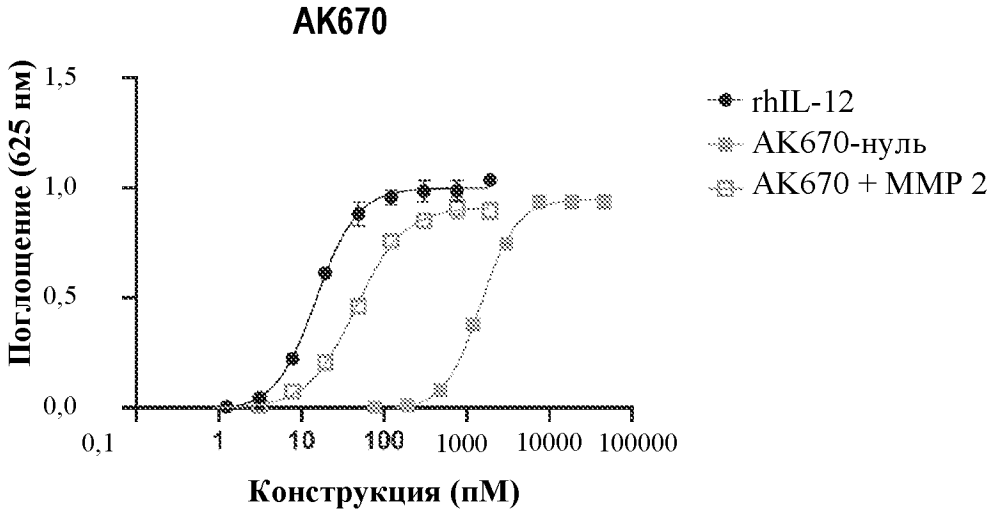
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	15,13	
AK668-нуль	2293	151,6
AK668 + MMP 10	45,05	3,0

ФИГ. 48H



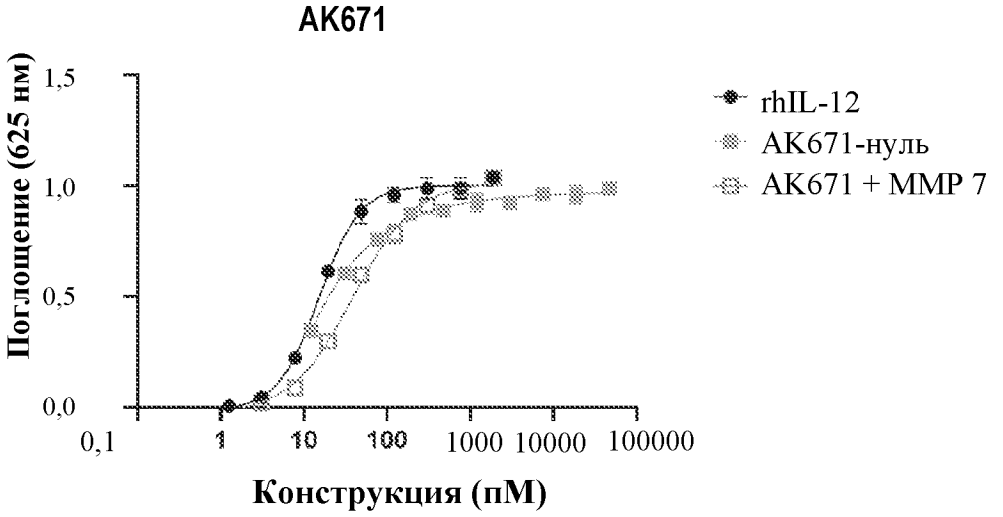
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	15,13	
AK669-нуль	1751	115,7
AK669 + MMP2	52,7	3,5

ФИГ. 48I



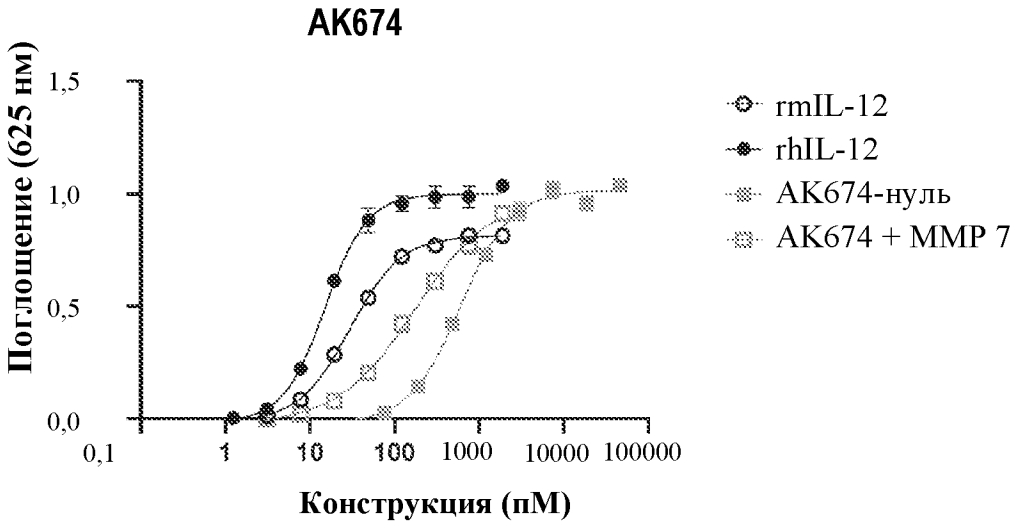
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	15,13	
AK670-нуль	1478	97,7
AK670 + MMP 2	45,49	3,0

ФИГ. 48J



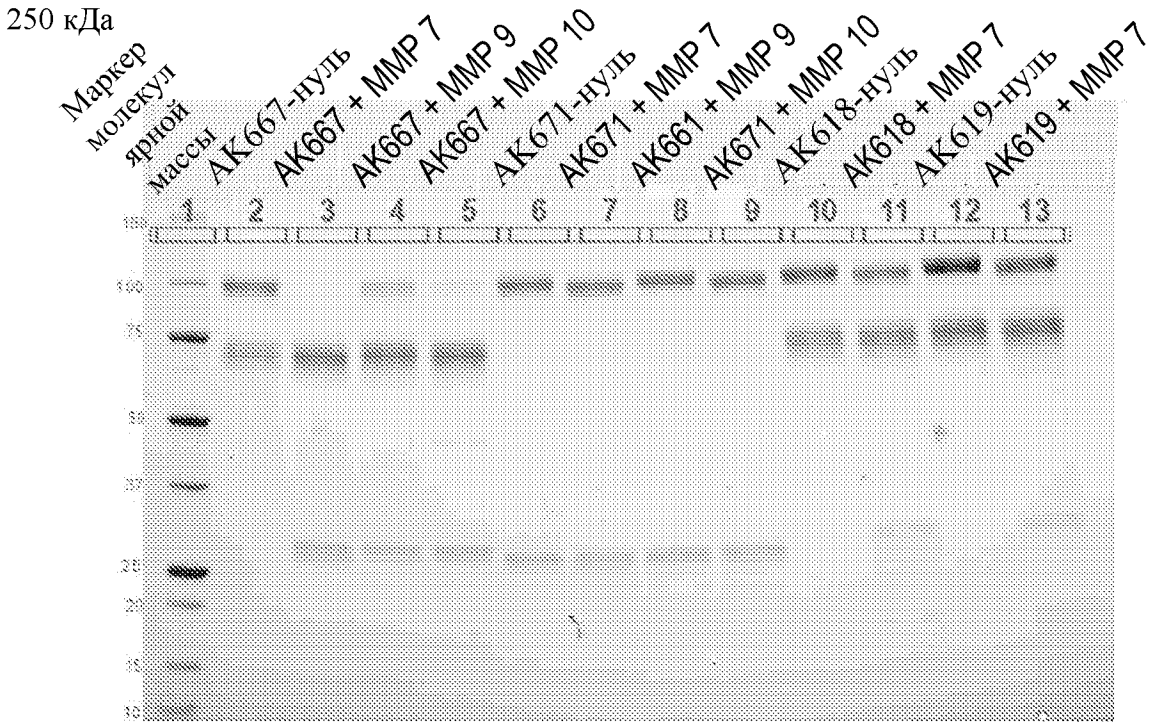
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	15,13	
AK671-нуль	~0,0003067*	N/A
AK671 + MMP 7	38,44	2,5

ФИГ. 48K

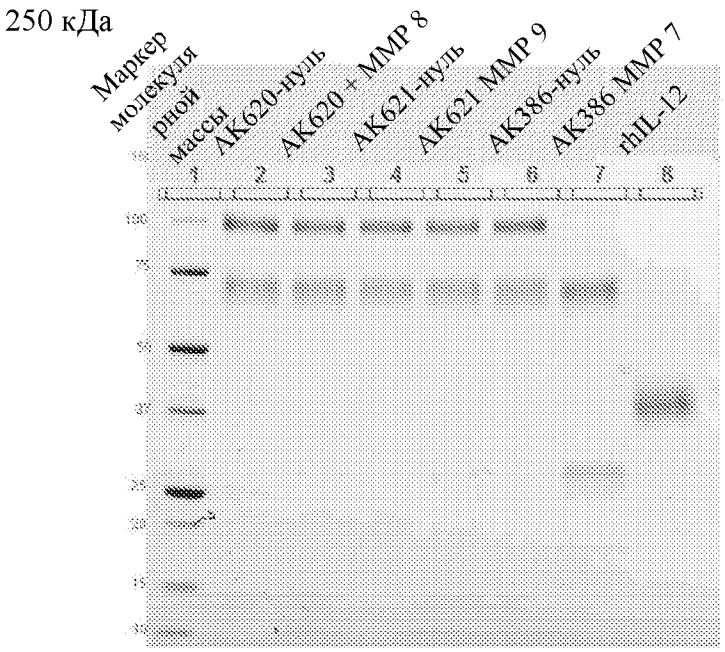


Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rmIL-12	29,82	
AK674-нуль	603,8	20,2
AK674 + MMP 7	177,2	5,9

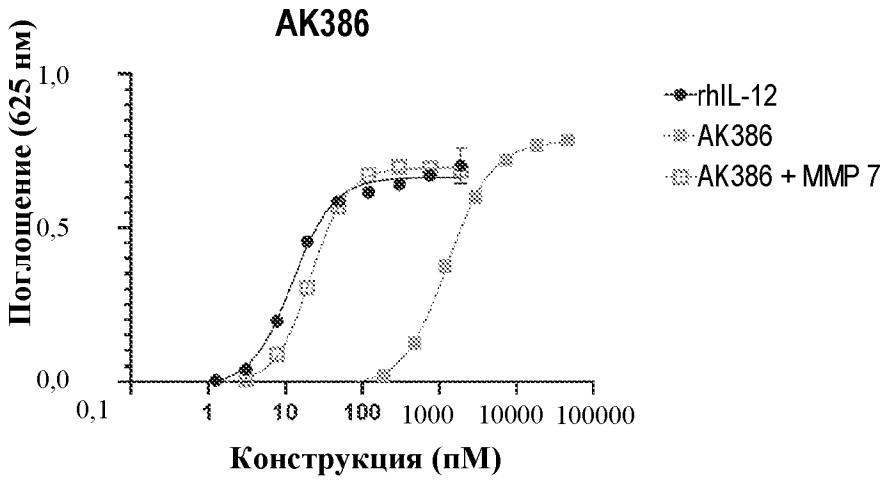
ФИГ. 49А



ФИГ. 49В

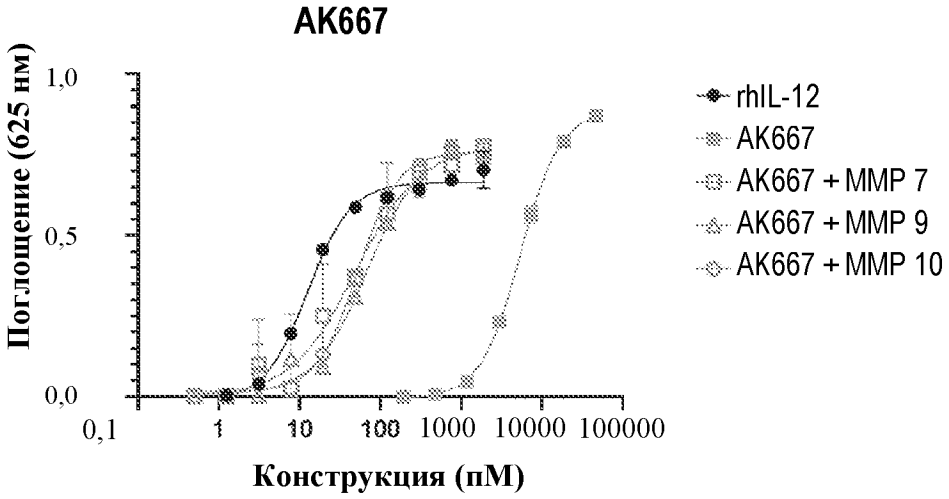


ФИГ. 50А



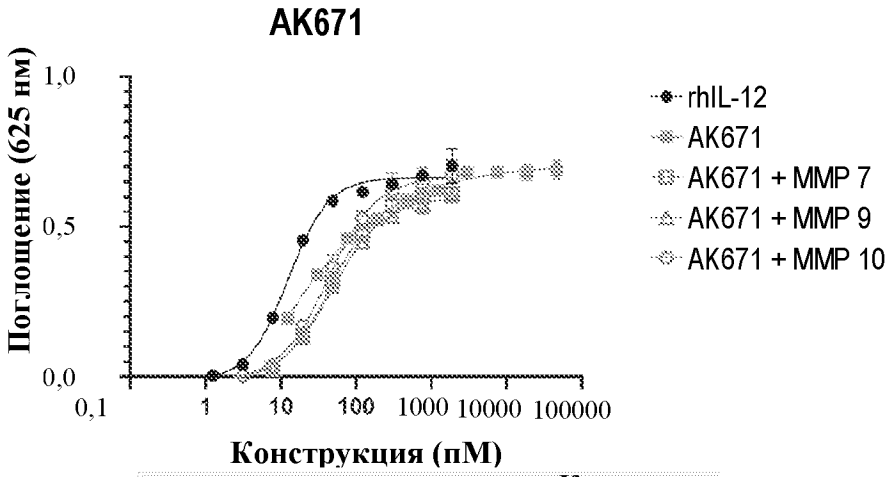
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	12,55	N/A
AK386	1294	103,1
AK386 + MMP 7	21,76	1,7

ФИГ. 50В



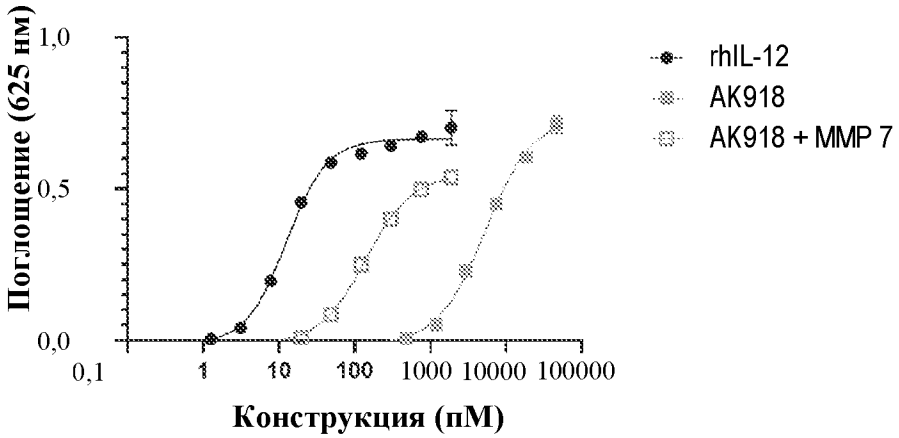
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	12,55	N/A
AK667	5412	431,2
AK667 + MMP 7	49,24	3,9
AK667 + MMP 9	67,88	5,4
AK667 + MMP 10	52,29	4,2

ФИГ. 50C



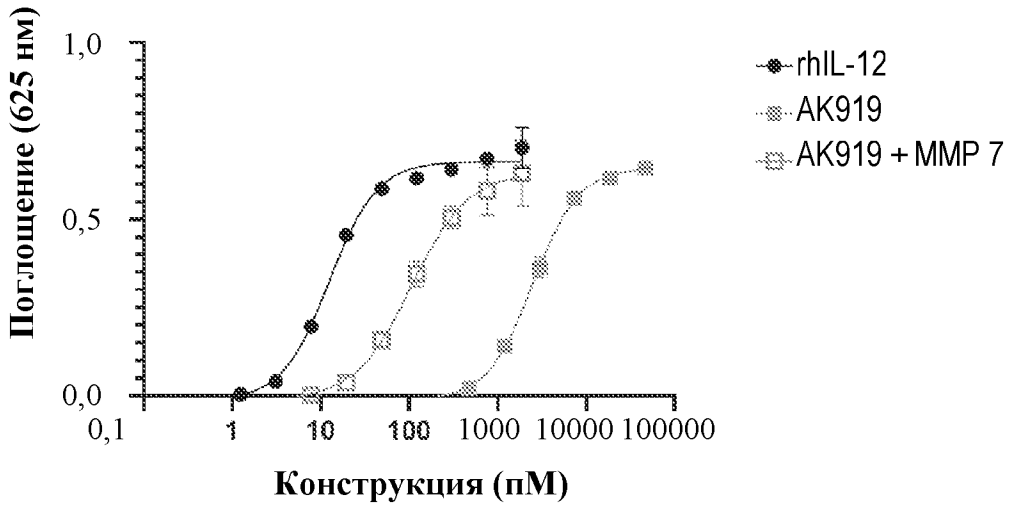
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	12,55	N/A
AK671	1,36*	0,1*
AK671 + MMP 7	46,04	3,7
AK671 + MMP 9	48,42	3,9
AK671 + MMP 10	42,47	3,4

ФИГ. 50D (AK918)



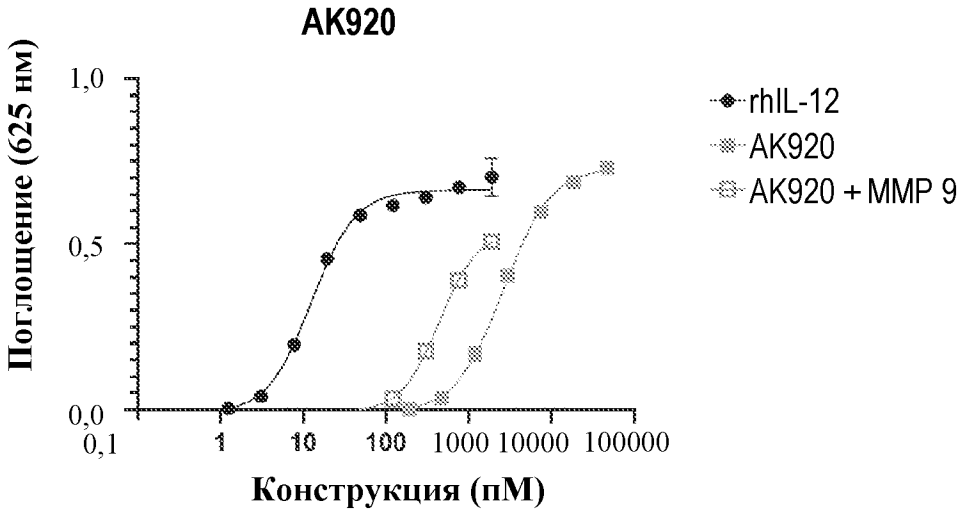
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	12,55	N/A
AK918	5372	428,0
AK918 + MMP 7	141	11,2

ФИГ. 50E (AK919)



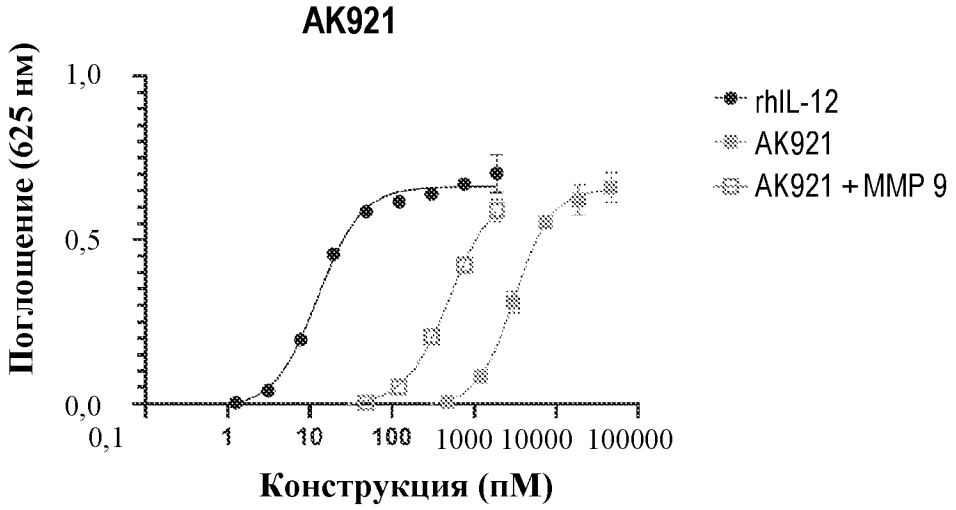
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	12,55	N/A
AK919	2506	199,7
AK919 + MMP 7	106,5	8,5

ФИГ. 50F



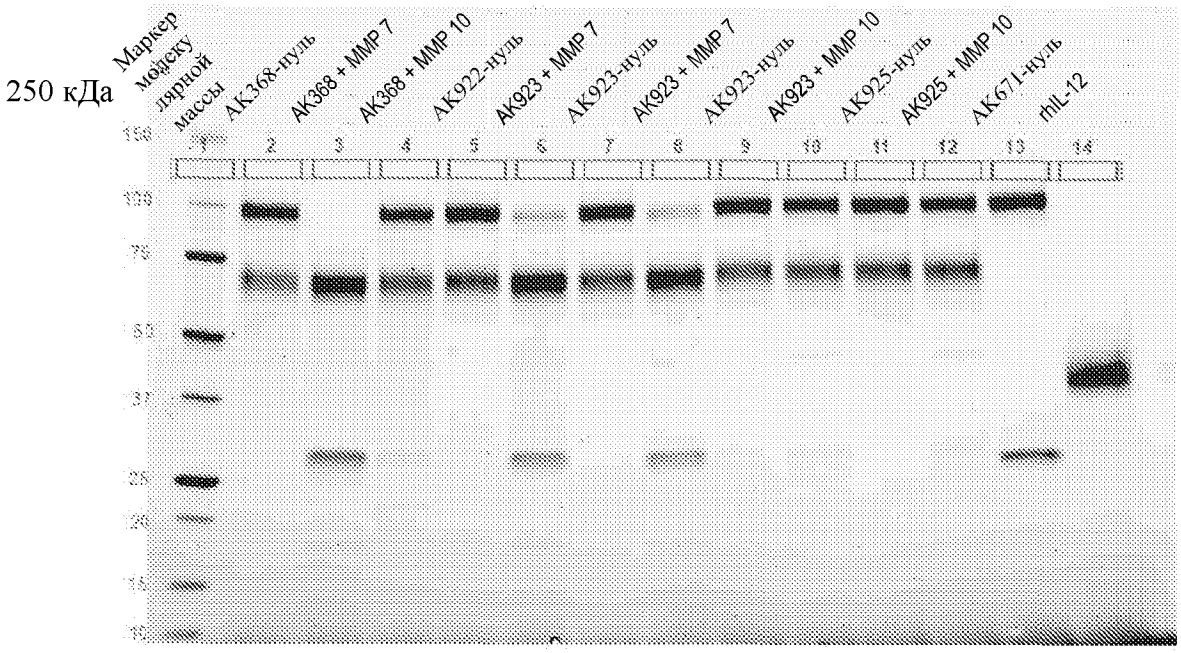
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	12,55	N/A
AK920	2600	207,2
AK920 + MMP 9	442,9	35,3

ФИГ. 50G

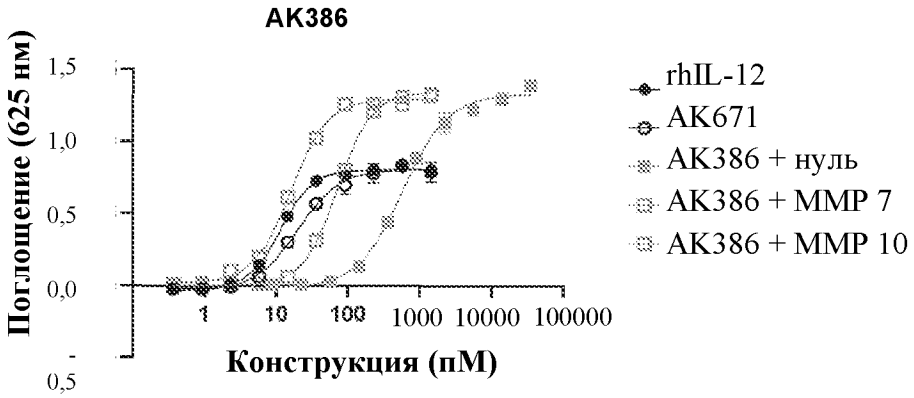


Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	12,55	N/A
AK921	3119	248,5
AK921 + MMP 9	518,4	41,3

ФИГ. 51

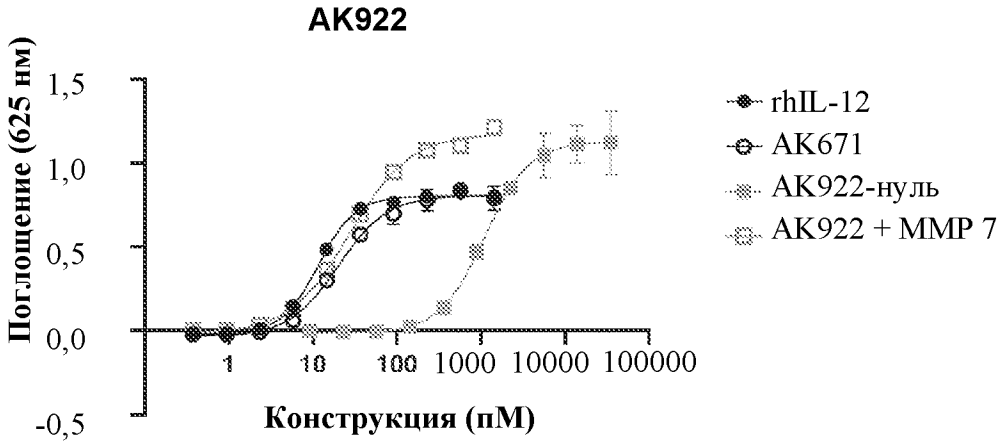


ФИГ. 52А



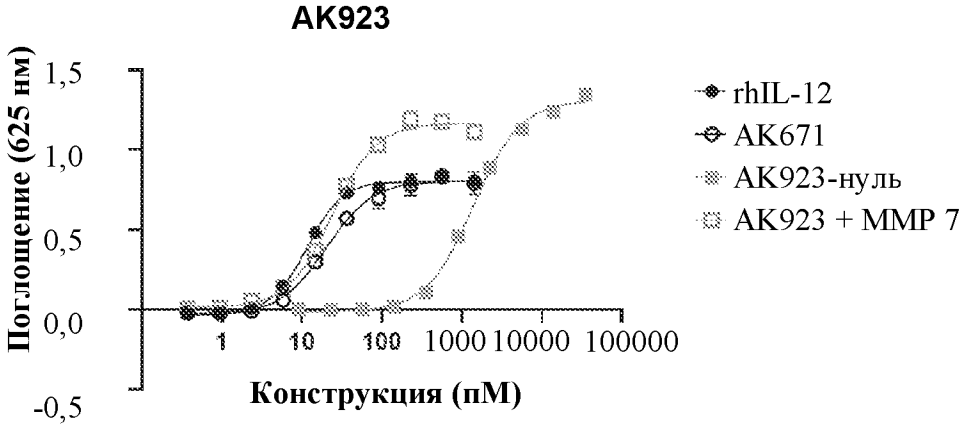
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	11,69	N/A
AK671	20,12	N/A
AK386-нуль	580,8	28,9
AK386 + MMP 7	16,09	0,8
AK386 + MMP 10	71,95	3,6

ФИГ. 52B



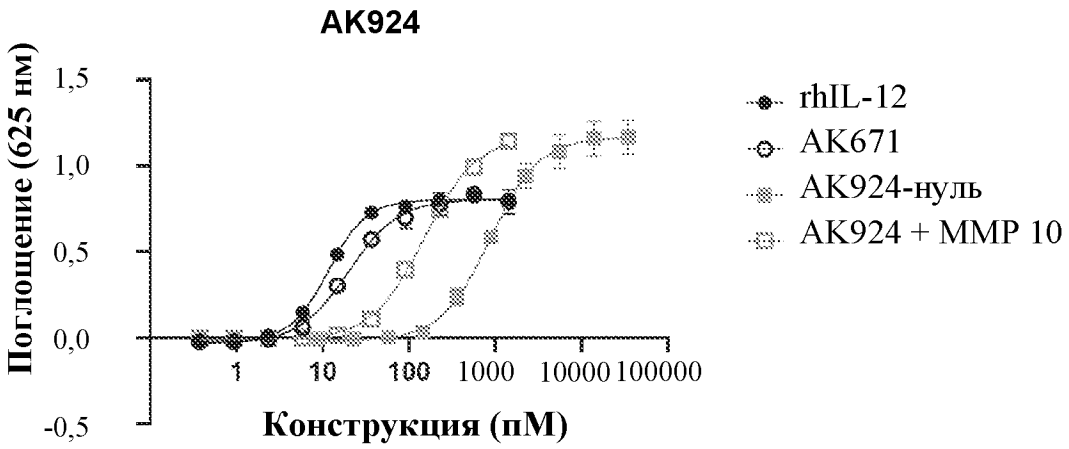
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	11,69	
AK671	20,12	
AK922-нуль	1102	54,8
AK922 + MMP 7	27,5	1,4

ФИГ. 52C



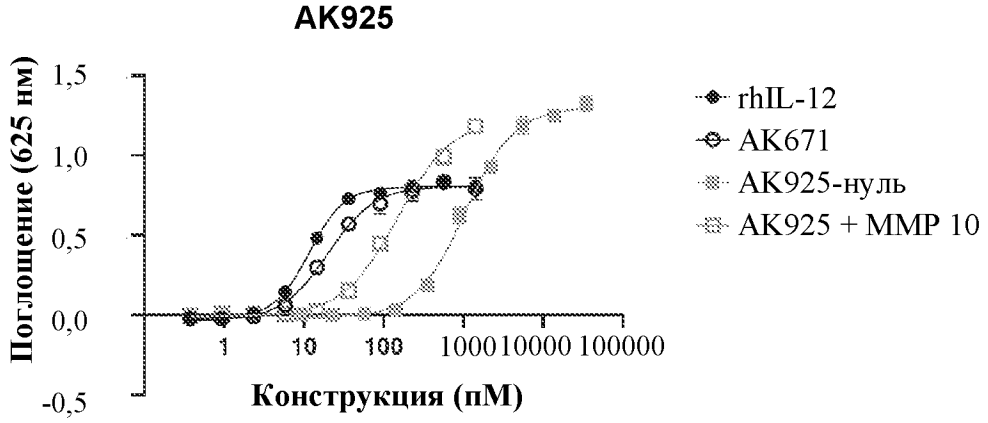
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	11,69	
AK671	20,12	
AK923-нуль	1393	69,2
AK923 + MMP 7	23,84	1,2

ФИГ. 52D

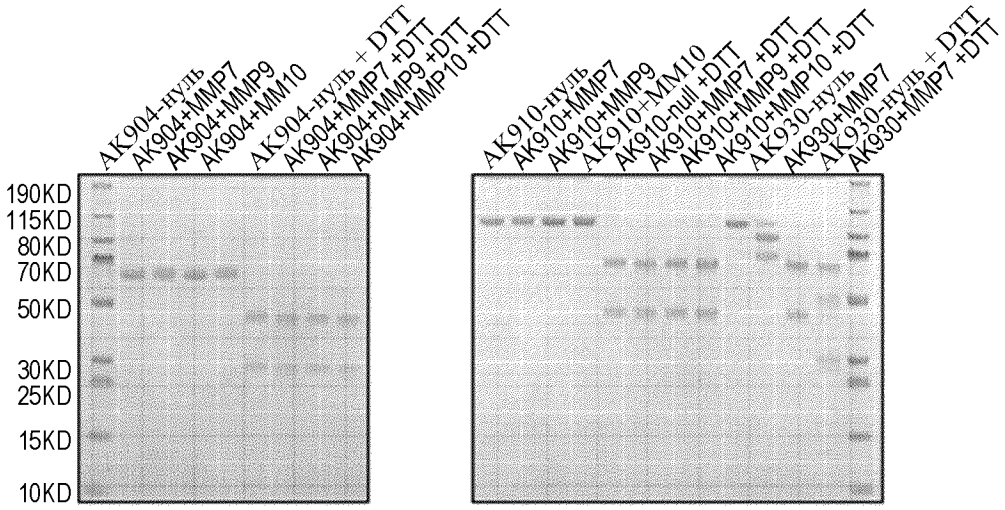


Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	11,69	
AK671	20,12	
AK924-нуль	876,2	43,5
AK924 + MMP 10	151	7,5

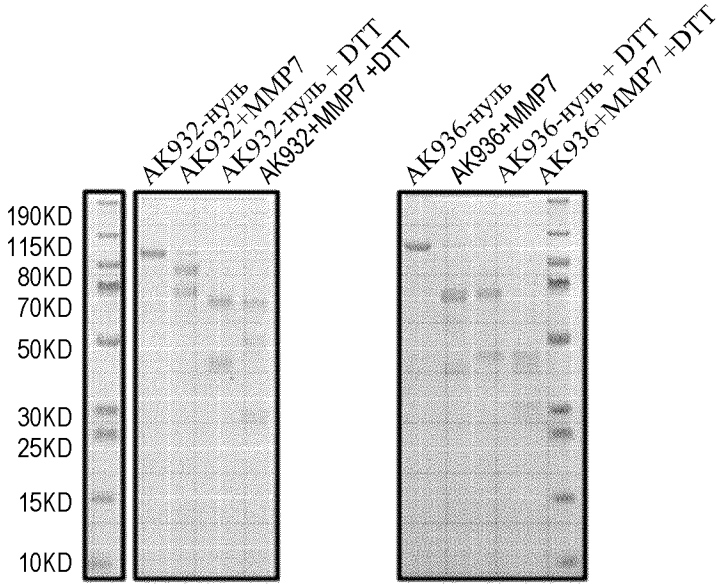
ФИГ. 52E



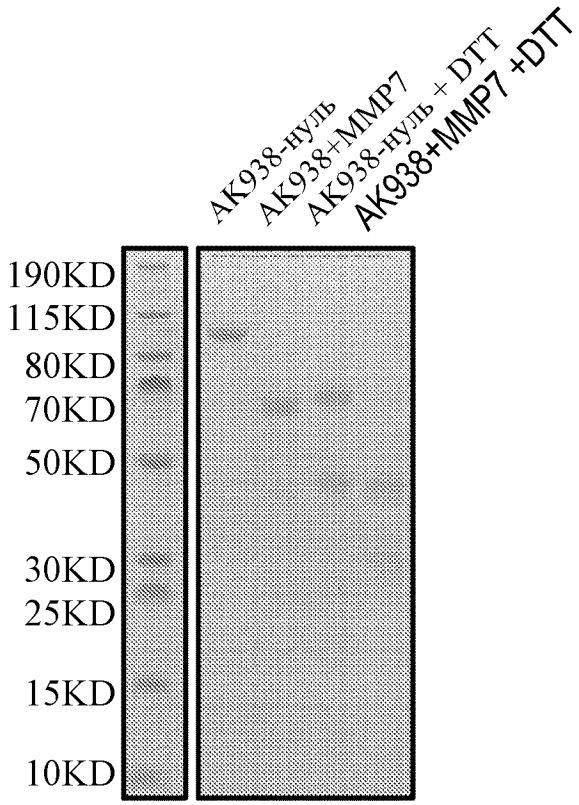
Конструкция	EC50 (пМ)	Кратность окклюзии
rhIL-12	11,69	
AK671	20,12	
AK925-нуль	1055	52,4
AK925 + MMP 10	149,5	7,4



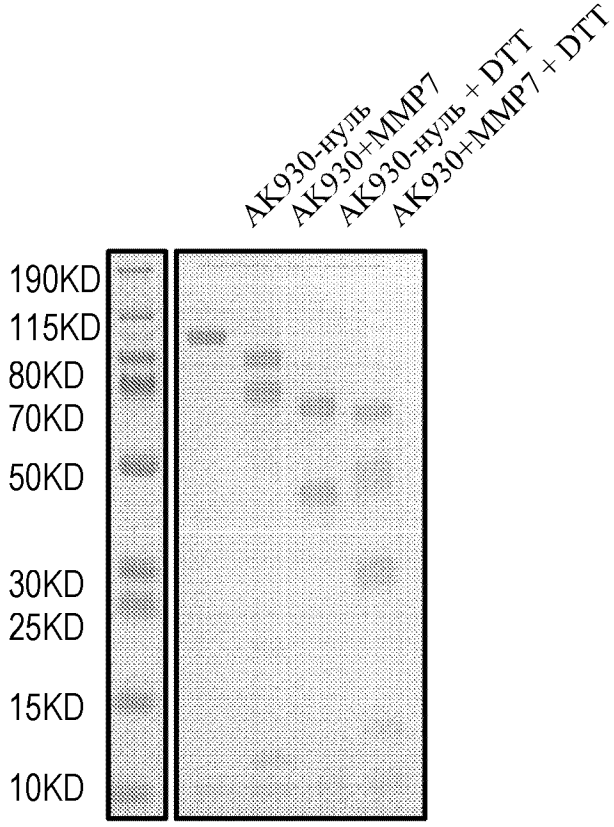
ФИГ. 53A



ФИГ. 53B

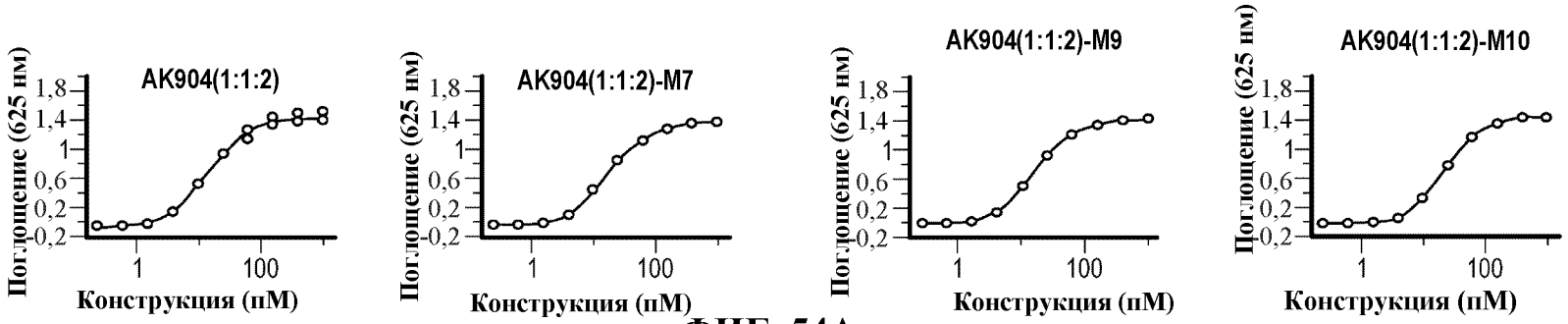


ФИГ. 53C

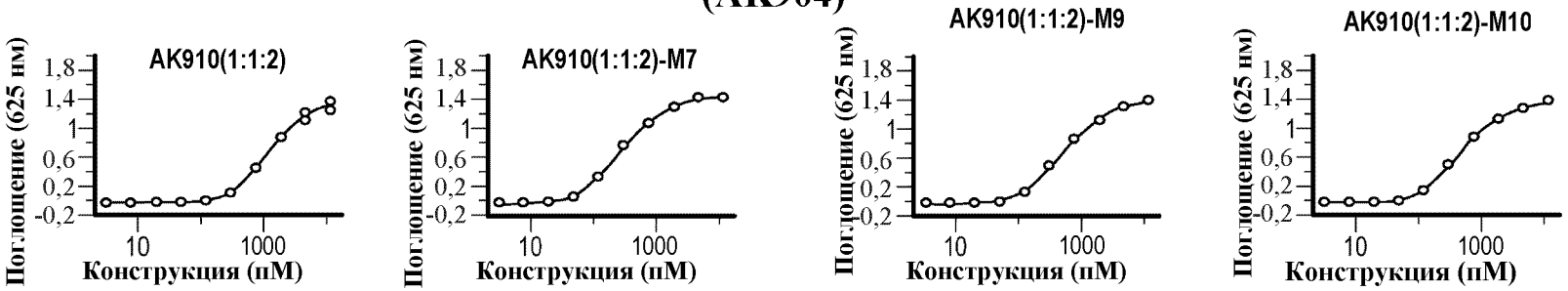


ФИГ. 53D

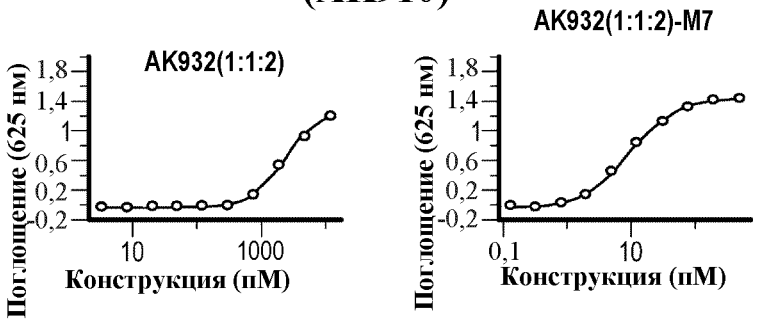
Процедуру расщепления конструкции осуществляли в течение 36 ч



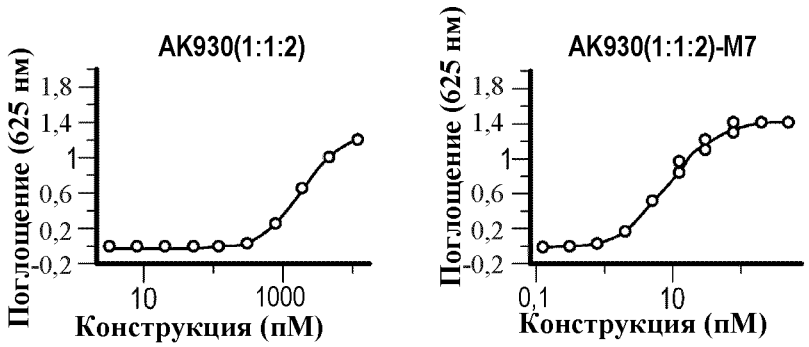
ФИГ. 54А
(АК904)



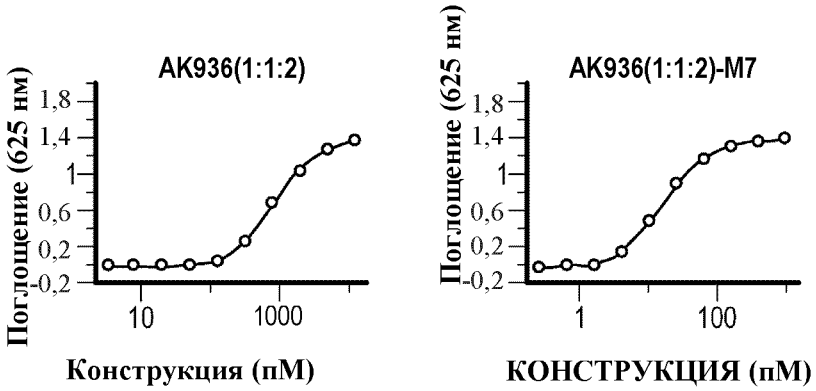
ФИГ. 54В
(АК910)



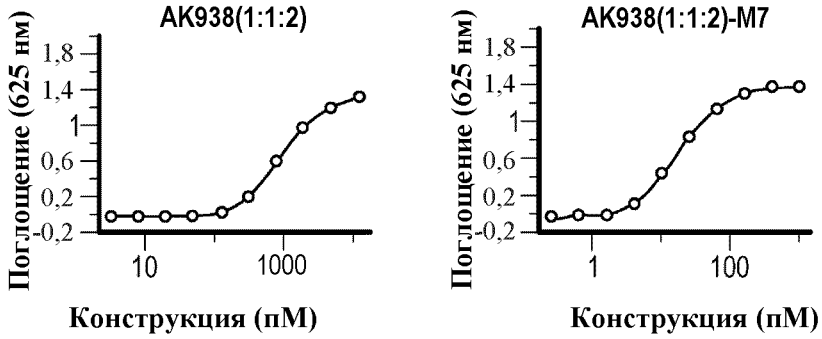
ФИГ. 54С (АК932)



ФИГ. 54F (AK930)



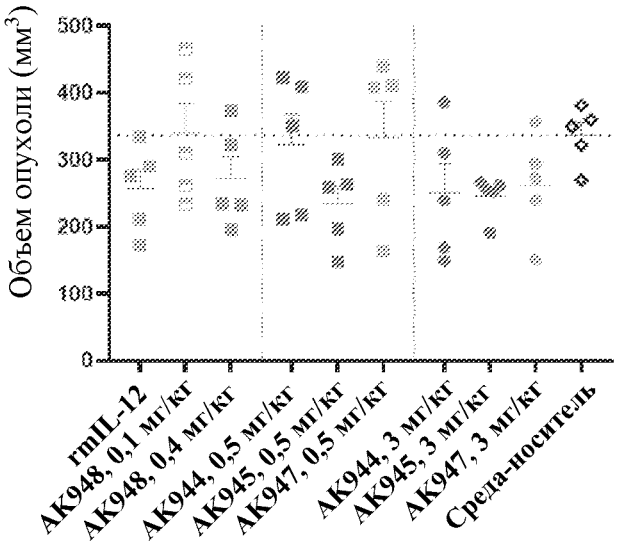
ФИГ. 54D (AK936)



ФИГ. 54E (AK938)

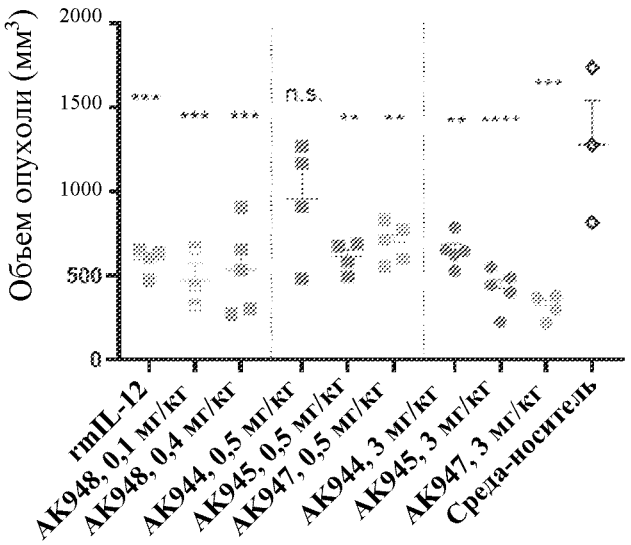
MB49

Объем опухоли



B16

Объем опухоли

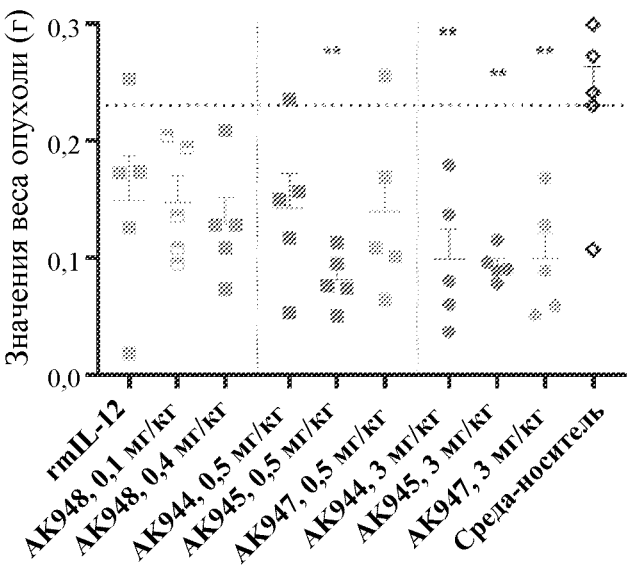


% TGI, мг/кг, по сравнению со средой-носителем	rm-IL12	АК948, 0,1 мг/кг	АК948, 0,4 мг/кг	АК944, 0,5 мг/кг	АК945, 0,5 мг/кг	АК947, 0,5 мг/кг	АК944, 3 мг/кг	АК945, 3 мг/кг	АК947, 3 мг/кг
MB49	23,6	-0,7	19,18	4,18	30,49	1,17	25,54	27,08	22
B16	62,76	77,53	58	40,04	61,71	45,51	49,19	66,86	80,1

ФИГ. 55

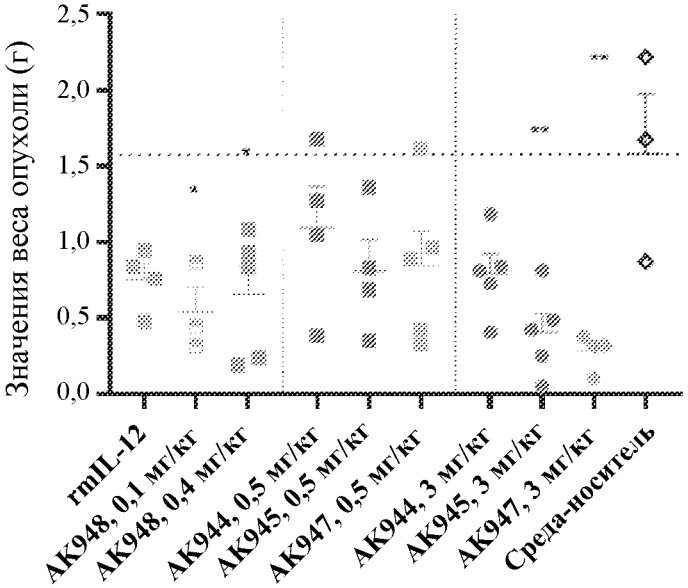
MB49

MB 49, значения веса опухоли



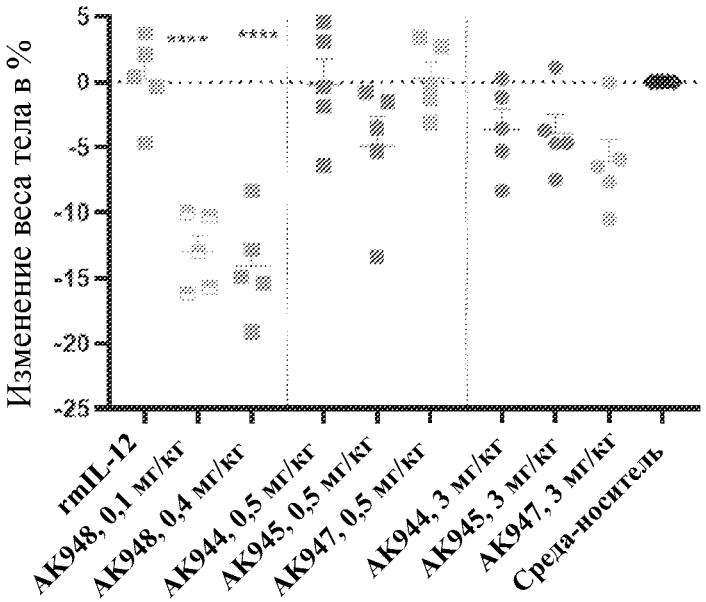
B16

B 16, значения веса опухоли

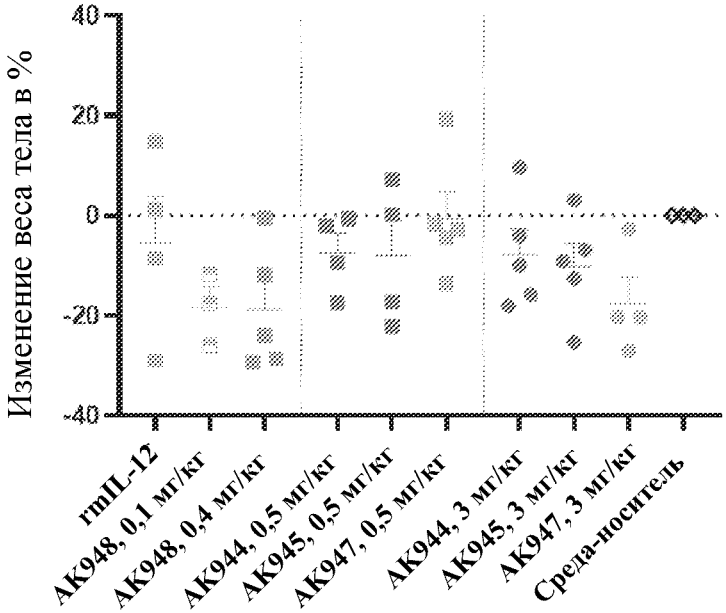


ФИГ. 56

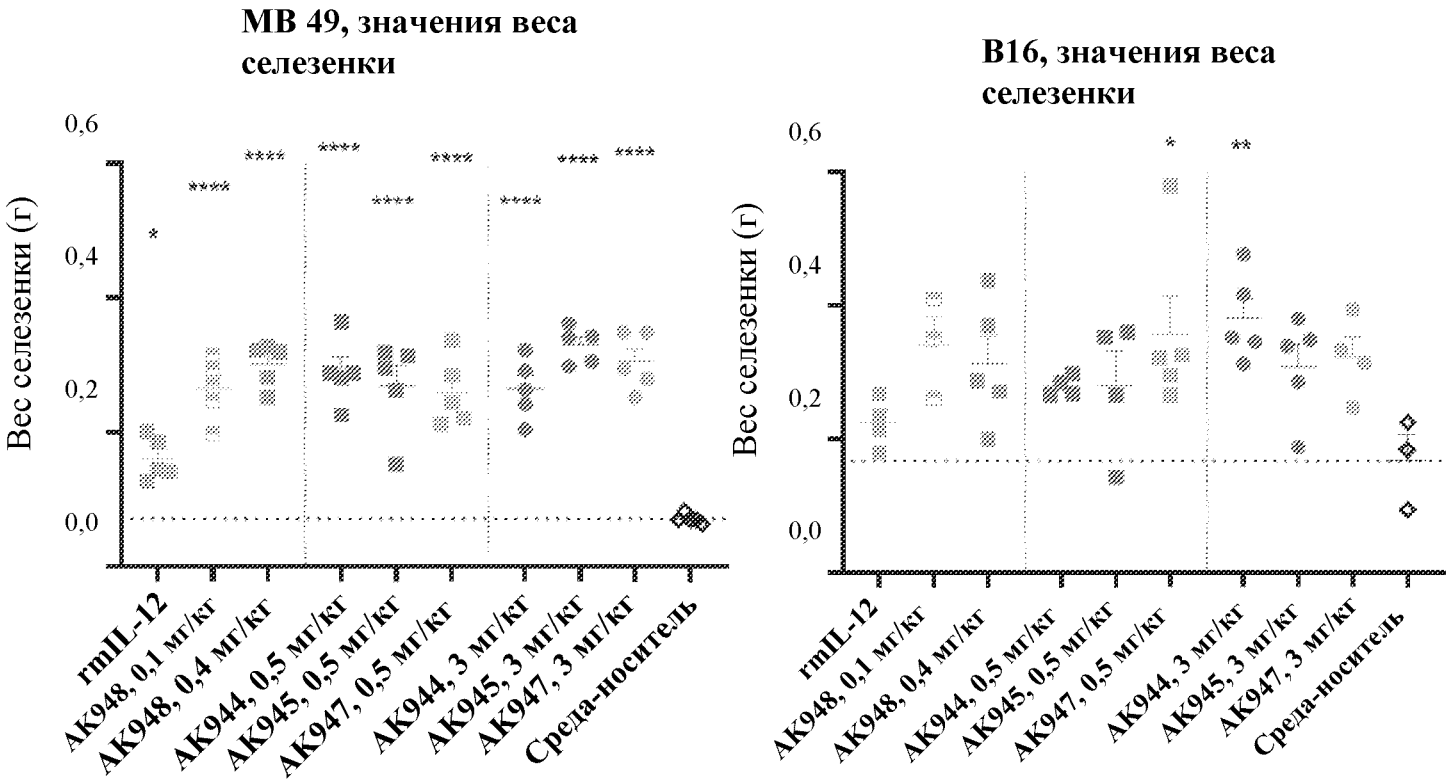
MB 49, % изменения веса тела_нормализованное значение



B16, % изменения веса тела_нормализованное значение

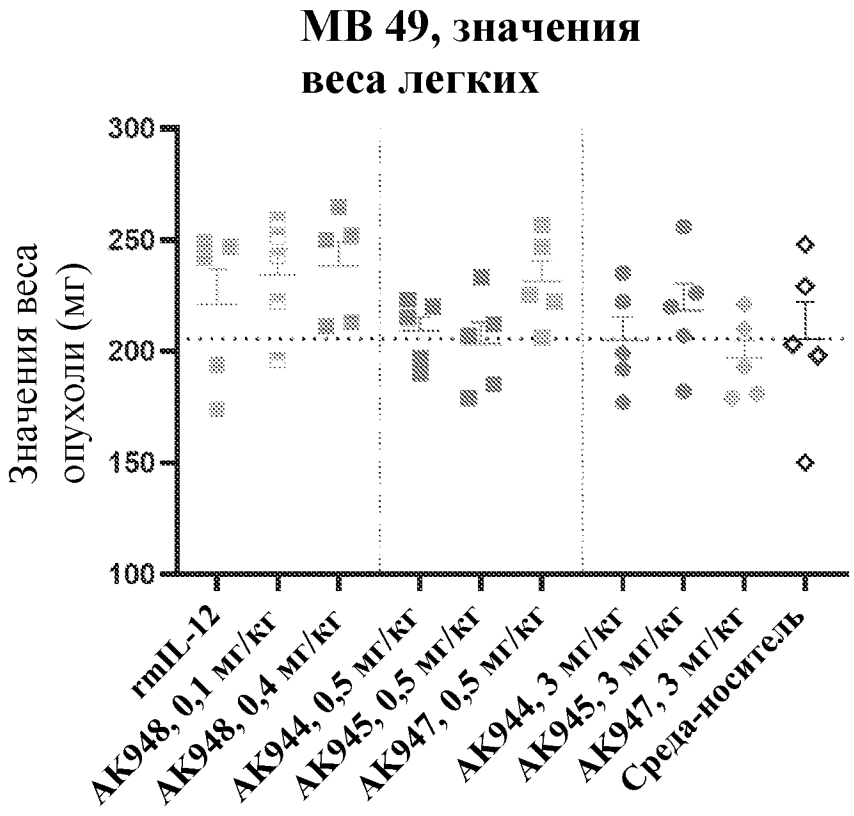


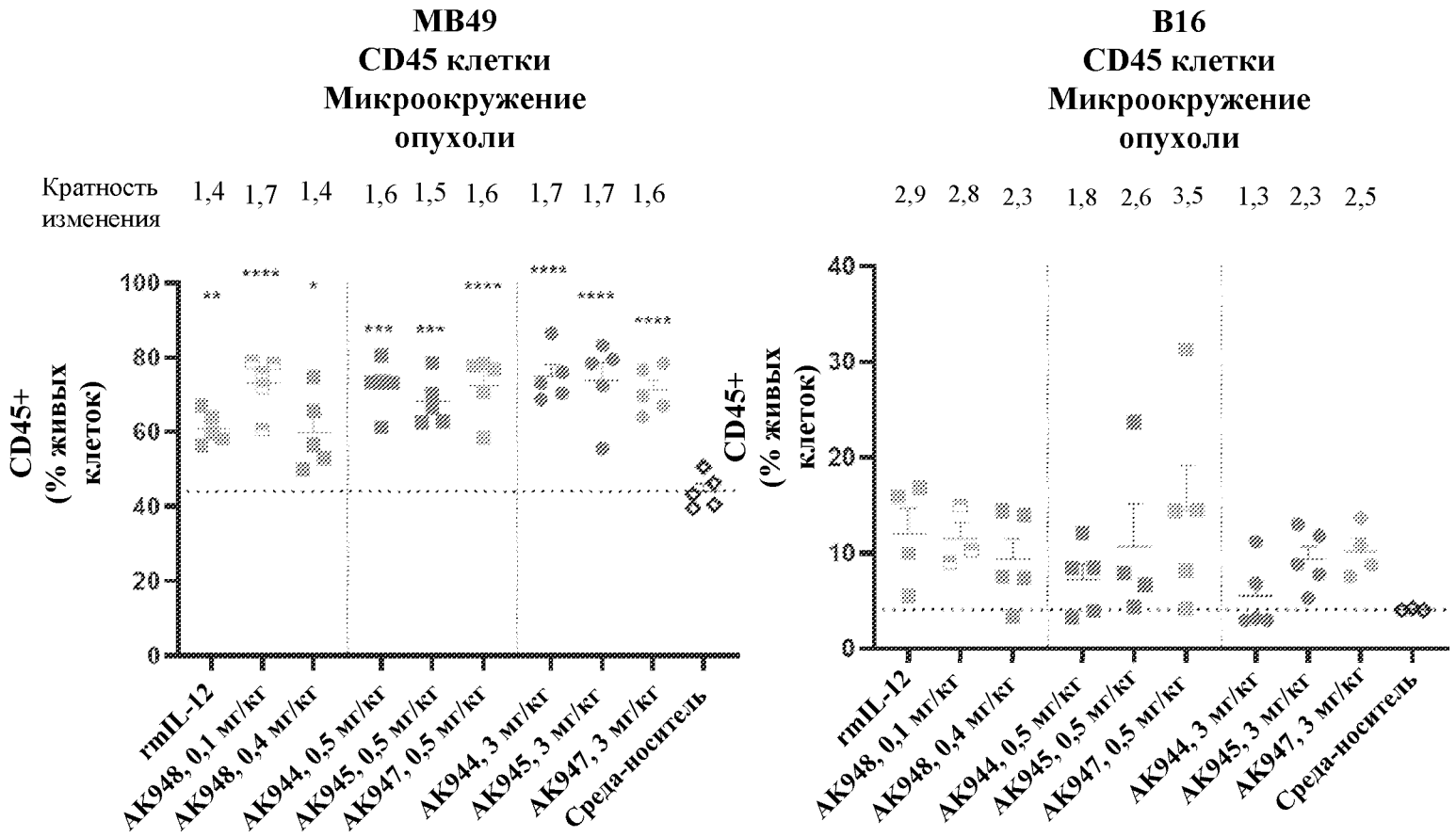
ФИГ. 57


MB 49, значения веса селезенки
Вес селезенки (г)
0,6
0,4
0,2
0,0
*
****
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
B16, значения веса селезенки
Вес селезенки (г)
0,6
0,4
0,2
0,0
*
**
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель

ФИГ. 58

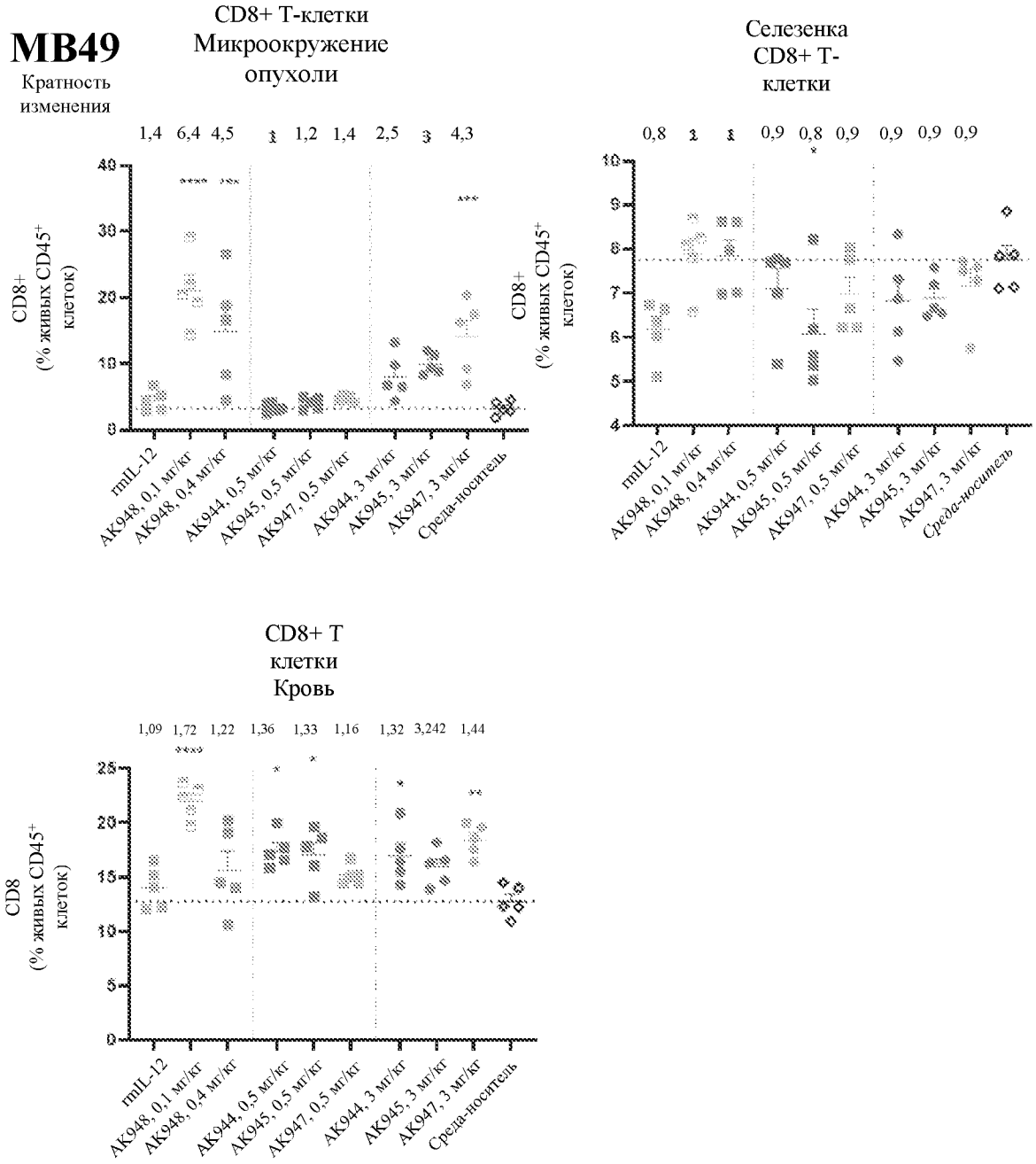
ФИГ. 59


MB 49, значения веса легких
Значения веса опухоли (мг)
300
250
200
150
100
rmIL-12
AK948, 0,1 мг/кг
AK948, 0,4 мг/кг
AK944, 0,5 мг/кг
AK945, 0,5 мг/кг
AK947, 0,5 мг/кг
AK944, 3 мг/кг
AK945, 3 мг/кг
AK947, 3 мг/кг
Среда-носитель


MB49
CD45 клетки
Микроокружение
опухоли
Кратность изменения
1,4 1,7 1,4 1,6 1,5 1,6 1,7 1,7 1,6
CD45+ (% живых клеток)
100
80
60
40
20
0
**
****
*
***
***
****
****
****
****
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
B16
CD45 клетки
Микроокружение
опухоли
2,9 2,8 2,3 1,8 2,6 3,5 1,3 2,3 2,5
CD45+ (% живых клеток)
40
30
20
10
0
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель

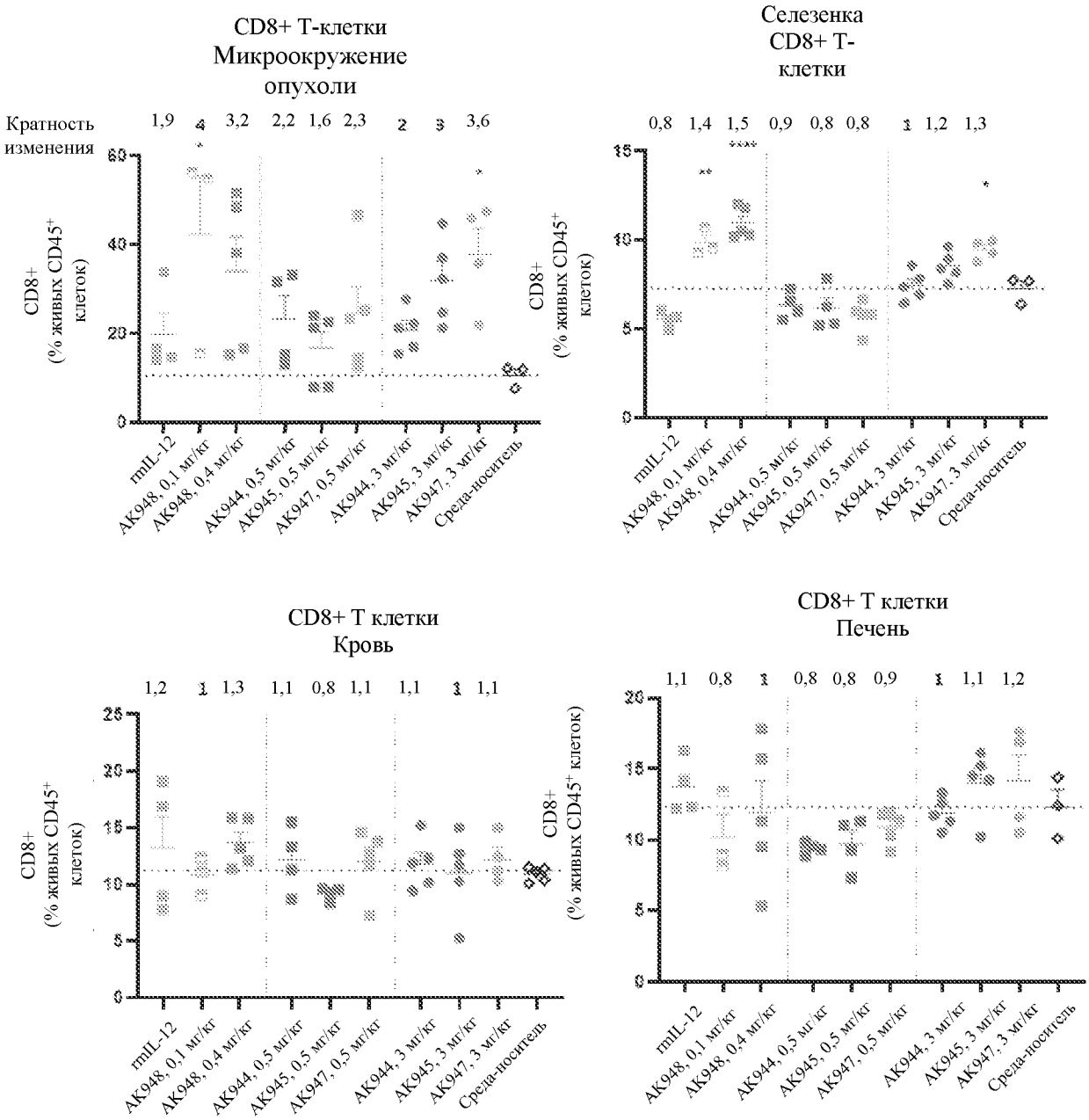
ФИГ. 60

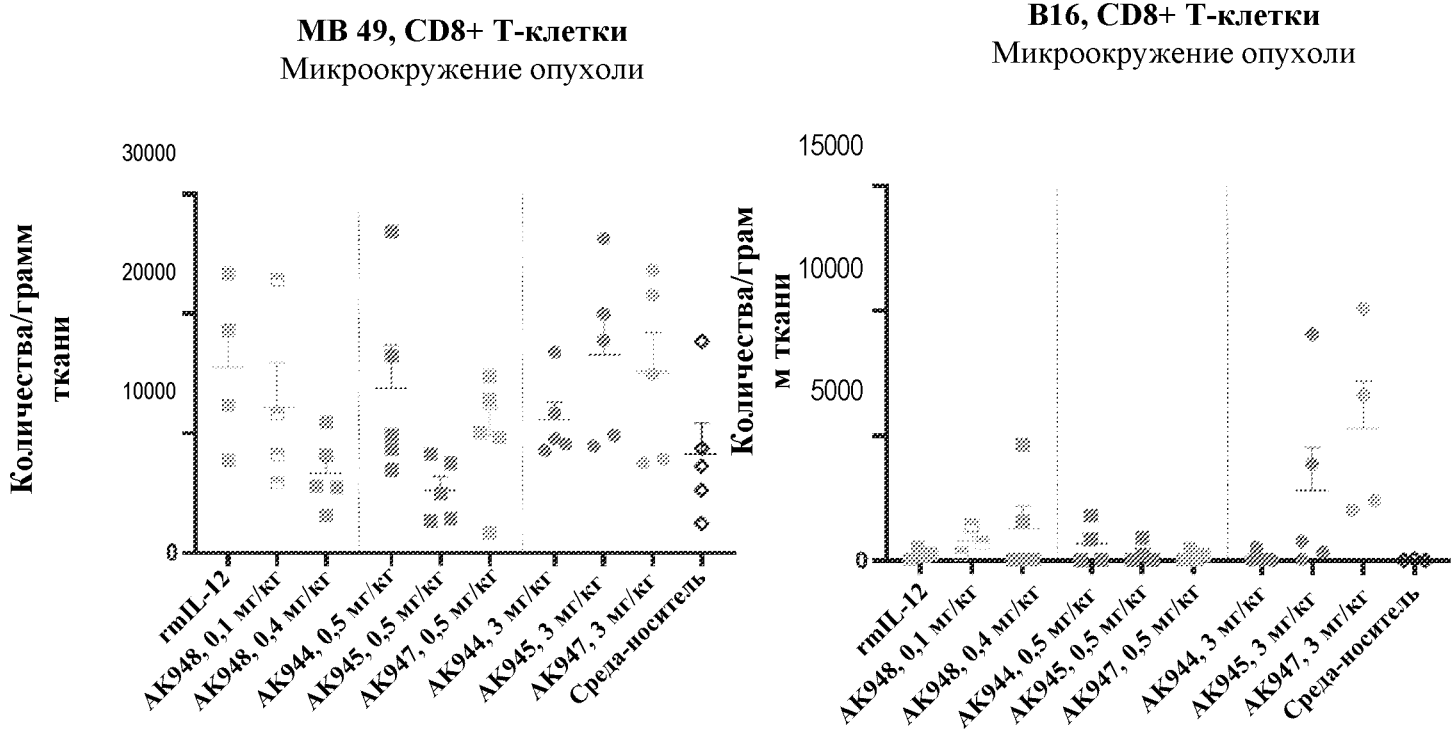
ФИГ. 61А


MB49
Кратность изменения
CD8+ Т-клетки Микроокружение опухоли
1,4 6,4 4,5 1 1,2 1,4 2,5 3 4,3
CD8+ (% живых CD45+ клеток)
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
Селезенка CD8+ Т-клетки
0,8 1 1 0,9 0,8 0,9 0,9 0,9 0,9
CD8+ (% живых CD45+ клеток)
CD8+ Т клетки Кровь
1,09 1,72 1,22 1,36 1,33 1,16 1,32 3,242 1,44
CD8 (% живых CD45+ клеток)

ФИГ. 61B

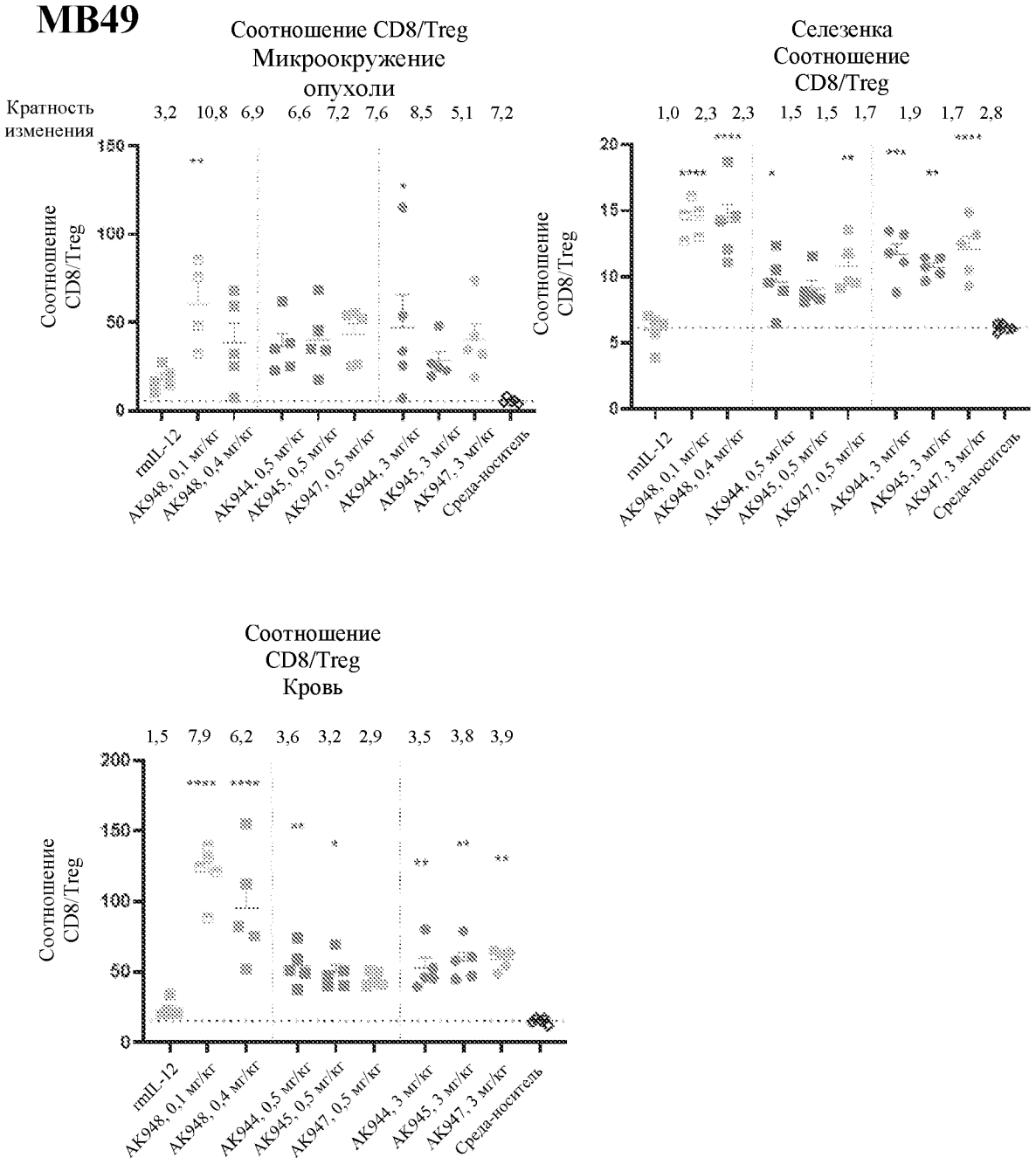
B16


CD8+ Т-клетки
Микроокружение опухоли
Кратность изменения
1,9 4 3,2 2,2 1,6 2,3 2 3 3,6
CD8+ (% живых CD45+ клеток)
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
Селезенка
CD8+ Т-клетки
0,8 1,4 1,5 0,9 0,8 0,8 1 1,2 1,3
CD8+ Т клетки
Кровь
1,2 1 1,3 1,1 0,8 1,1 1,1 1 1,1
CD8+ Т клетки
Печень
1,1 0,8 1 0,8 0,8 0,9 1 1,1 1,2

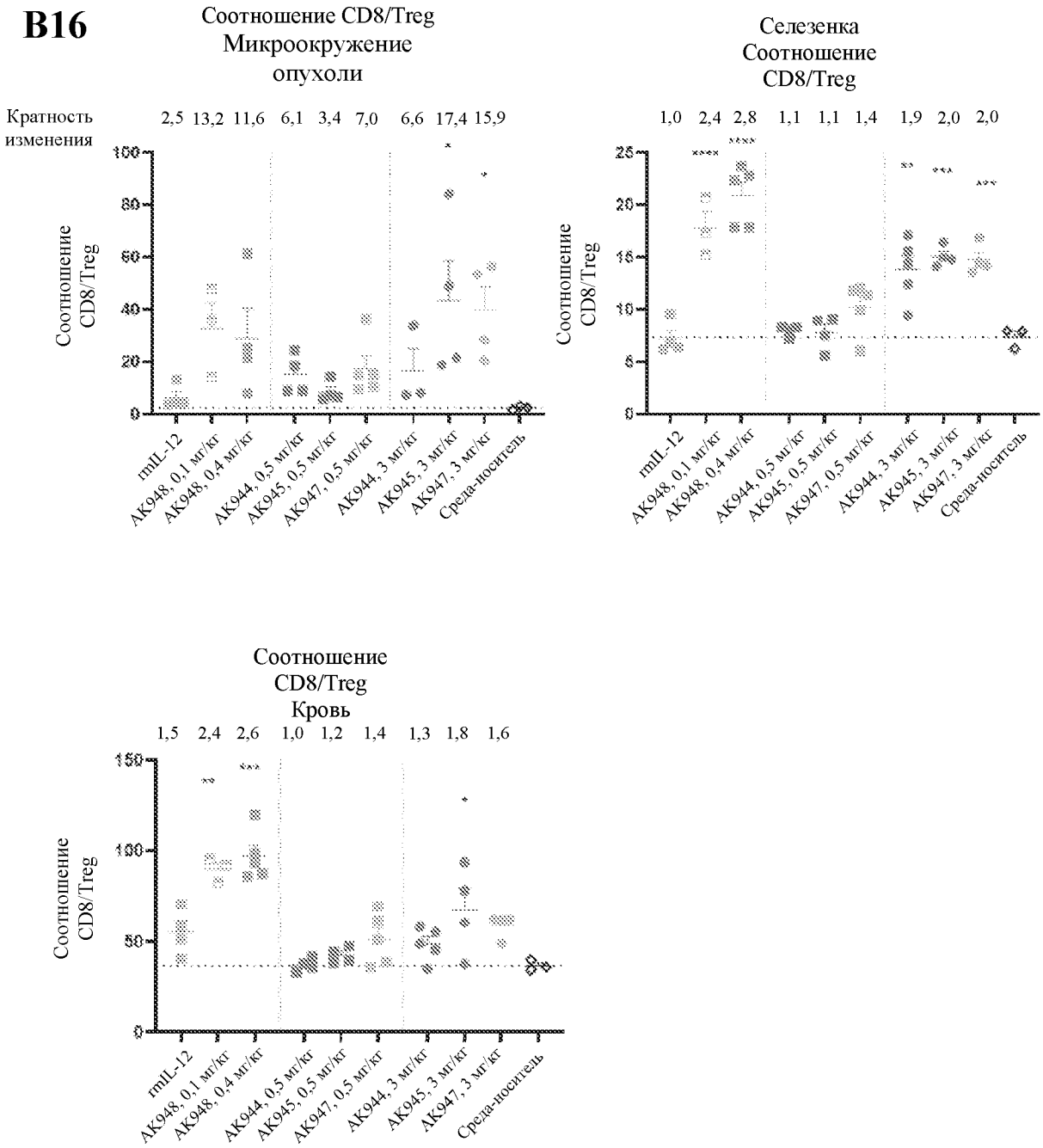

MB 49, CD8+ Т-клетки
Микроокружение опухоли
Количества/грамм ткани
30000
20000
10000
0
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
B16, CD8+ Т-клетки
Микроокружение опухоли
Количества/грам м ткани
15000
10000
5000
0
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель

ФИГ. 62

ФИГ. 63А

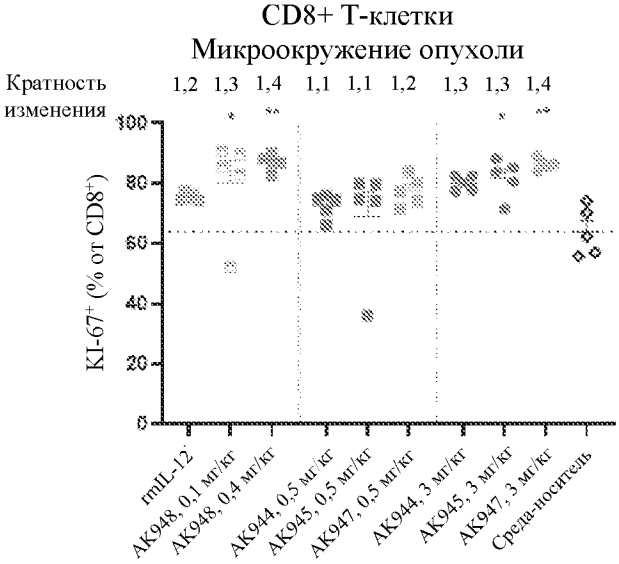

MB49
Соотношение CD8/Treg
Микроокружение
опухоли
Кратность
изменения
3,2 10,8 6,9 6,6 7,2 7,6 8,5 5,1 7,2
Соотношение
CD8/Treg
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
Селезенка
Соотношение
CD8/Treg
1,0 2,3 2,3 1,5 1,5 1,7 1,9 1,7 2,8
Соотношение
CD8/Treg
Соотношение
CD8/Treg
Кровь
1,5 7,9 6,2 3,6 3,2 2,9 3,5 3,8 3,9
Соотношение
CD8/Treg

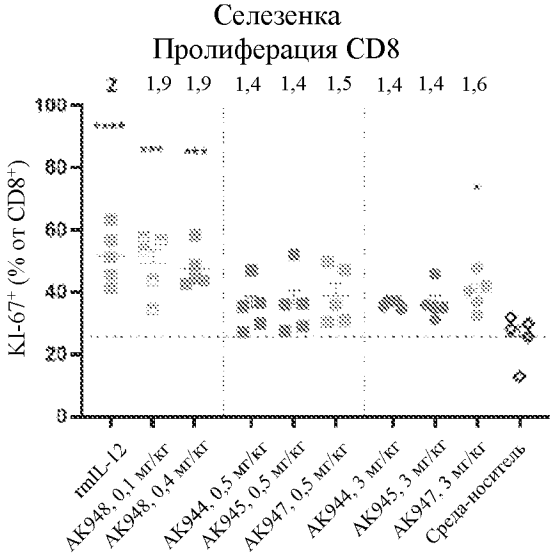
ФИГ. 63B

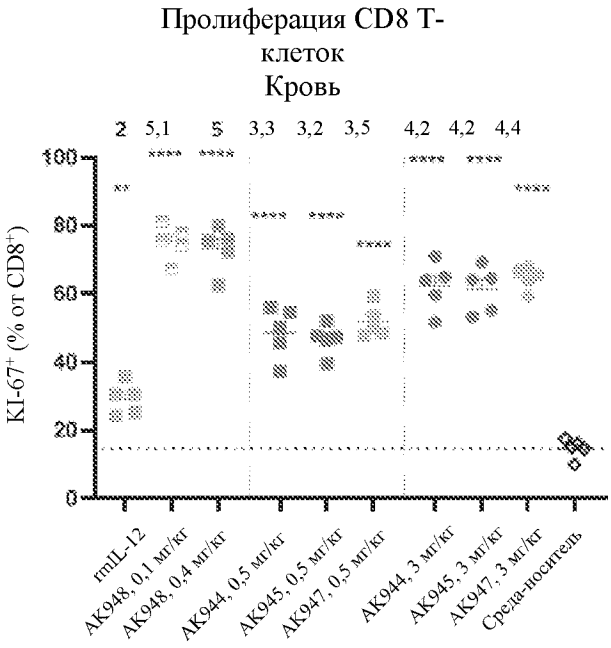

B16
Соотношение CD8/Treg
Микроокружение
опухоли
Кратность
изменения
2,5 13,2 11,6 6,1 3,4 7,0 6,6 17,4 15,9
Соотношение
CD8/Treg
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
Селезенка
Соотношение
CD8/Treg
1,0 2,4 2,8 1,1 1,1 1,4 1,9 2,0 2,0
Соотношение
CD8/Treg
Кровь
1,5 2,4 2,6 1,0 1,2 1,4 1,3 1,8 1,6

ФИГ. 64А

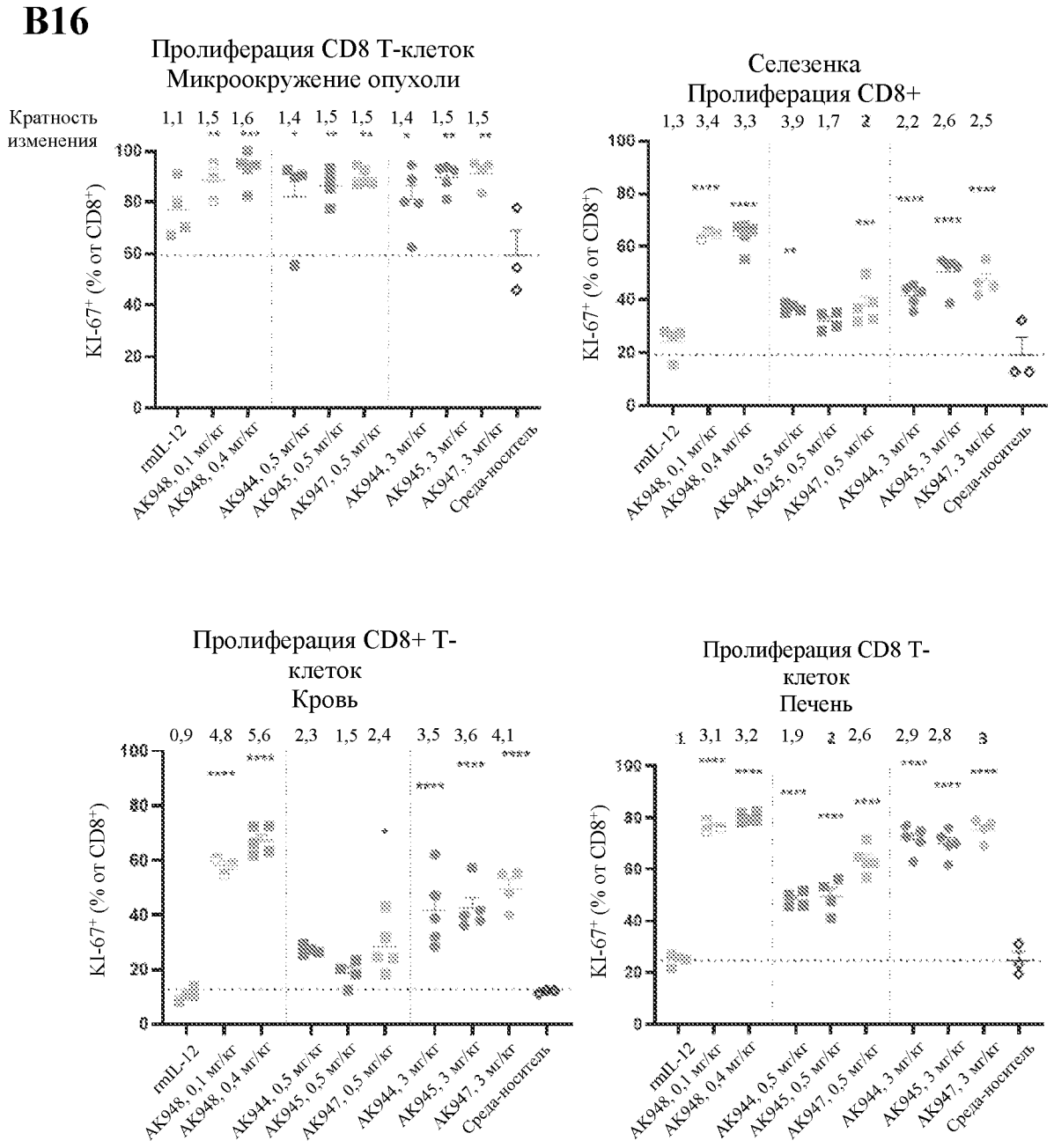
MB49


CD8+ Т-клетки
Микроокружение опухоли
Кратность изменения
1,2 1,3 1,4 1,1 1,1 1,2 1,3 1,3 1,4
KI-67+ (% от CD8+)
0
20
40
60
80
100
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель

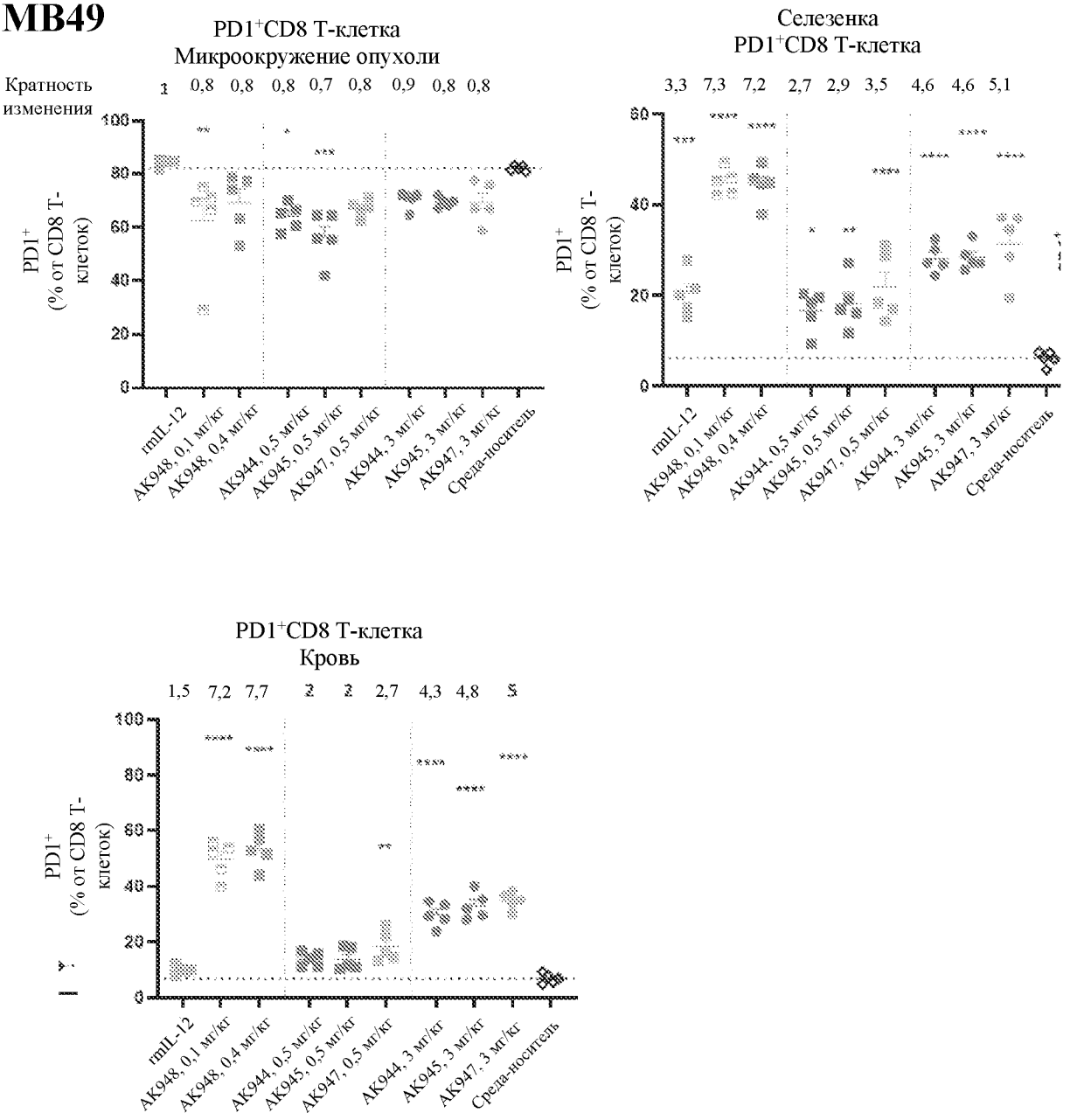

Селезенка
Пролиферация CD8
2 1,9 1,9 1,4 1,4 1,5 1,4 1,4 1,6
KI-67+ (% от CD8+)
0
20
40
60
80
100
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель


Пролиферация CD8 Т-клеток
Кровь
2 5,1 5 3,3 3,2 3,5 4,2 4,2 4,4
KI-67+ (% от CD8+)
0
20
40
60
80
100
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель

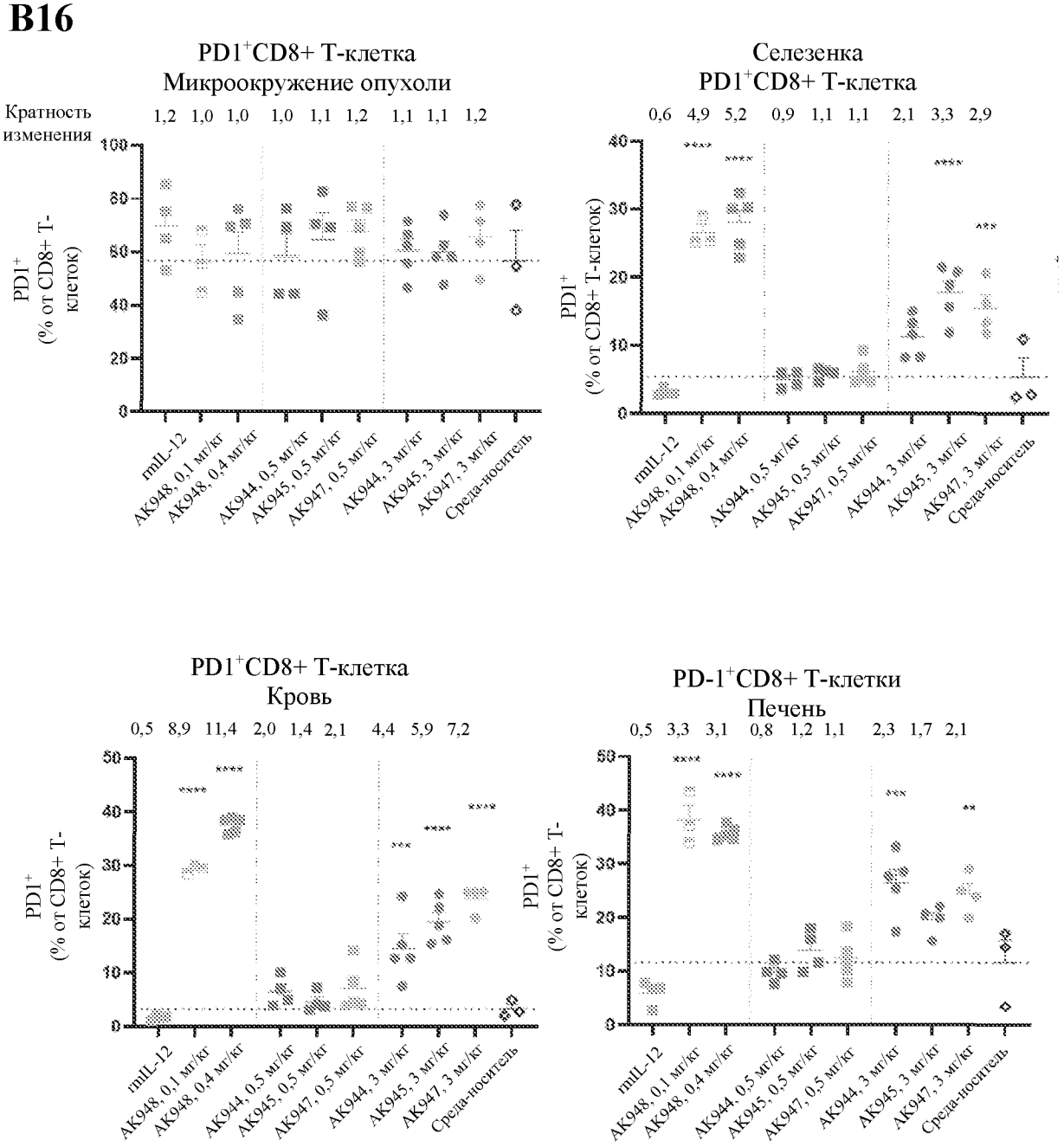
ФИГ. 64B


B16
Пролиферация CD8 Т-клеток
Микроокружение опухоли
Кратность изменения
1,1 1,5 1,6 1,4 1,5 1,5 1,4 1,5 1,5
KI-67+ (% от CD8+)
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
Селезенка
Пролиферация CD8+
1,3 3,4 3,3 3,9 1,7 2 2,2 2,6 2,5
Пролиферация CD8+ Т-клеток
Кровь
0,9 4,8 5,6 2,3 1,5 2,4 3,5 3,6 4,1
Пролиферация CD8 Т-клеток
Печень
1 3,1 3,2 1,9 2 2,6 2,9 2,8 3

ФИГ. 65А

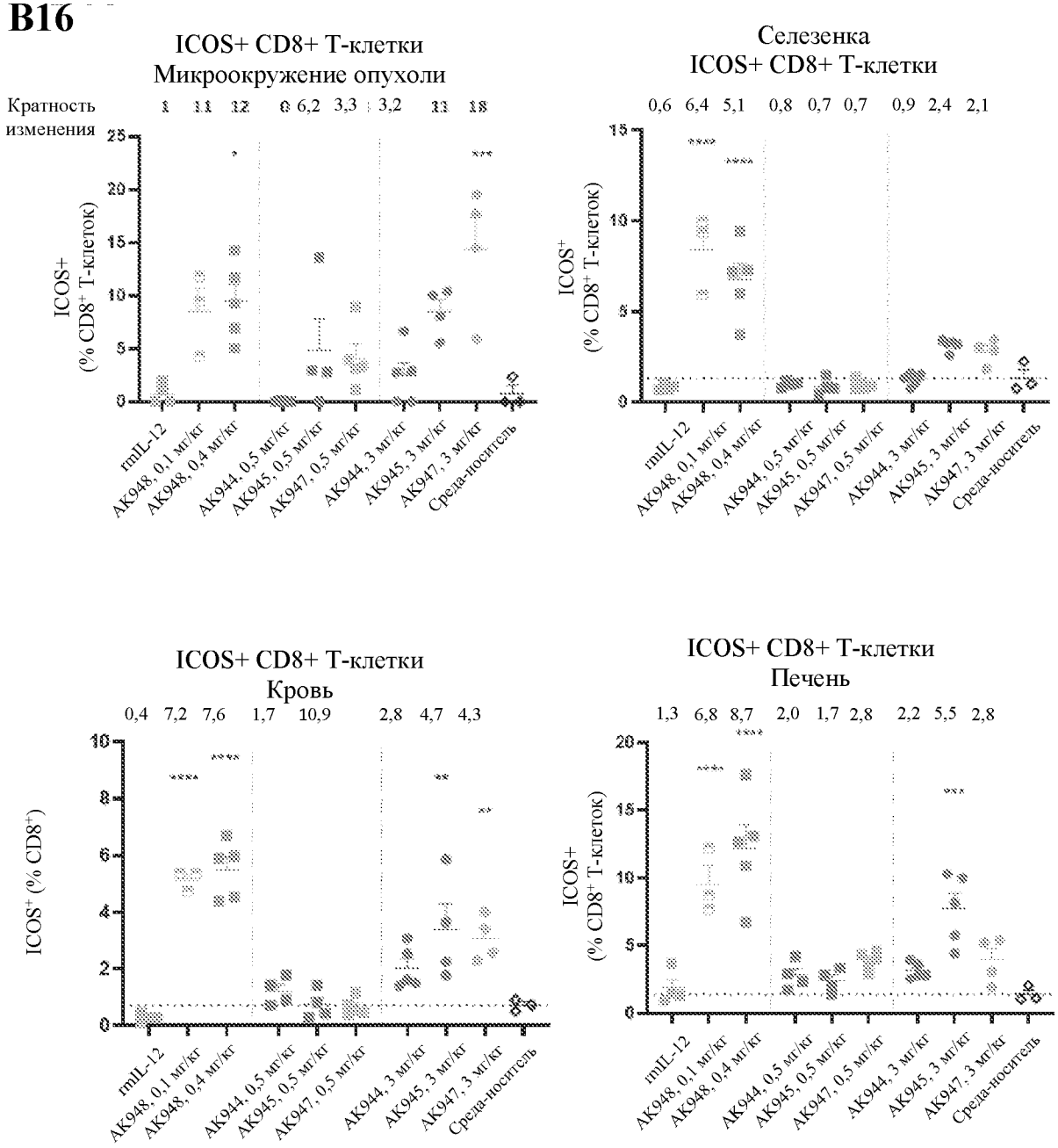

MB49
PD1+CD8 Т-клетка
Микроокружение опухоли
Кратность изменения
1 0,8 0,8 0,8 0,7 0,8 0,9 0,8 0,8
PD1+ (% от CD8 Т-клеток)
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
Селезенка
PD1+CD8 Т-клетка
3,3 7,3 7,2 2,7 2,9 3,5 4,6 4,6 5,1
PD1+ (% от CD8 Т-клеток)
PD1+CD8 Т-клетка
Кровь
1,5 7,2 7,7 2 2 2,7 4,3 4,8 5
PD1+ (% от CD8 Т-клеток)

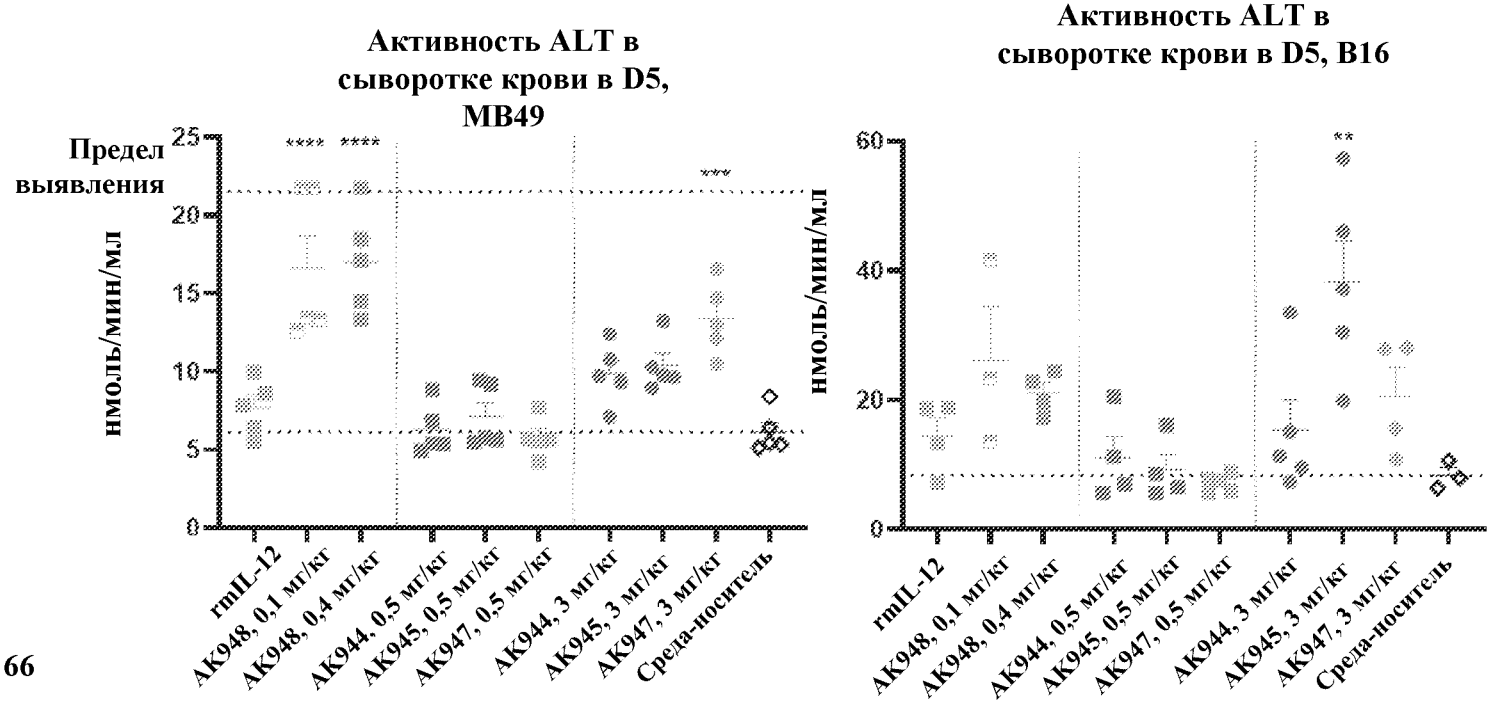
ФИГ. 65B


B16
PD1+CD8+ Т-клетка
Микроокружение опухоли
Кратность изменения
1,2 1,0 1,0 1,0 1,1 1,2 1,1 1,1 1,2
PD1+ (% от CD8+ Т-клеток)
Селезенка
PD1+CD8+ Т-клетка
0,6 4,9 5,2 0,9 1,1 1,1 2,1 3,3 2,9
PD1+ (% от CD8+ Т-клеток)
PD1+CD8+ Т-клетка
Кровь
0,5 8,9 11,4 2,0 1,4 2,1 4,4 5,9 7,2
PD1+ (% от CD8+ Т-клеток)
PD-1+CD8+ Т-клетки
Печень
0,5 3,3 3,1 0,8 1,2 1,1 2,3 1,7 2,1
PD1+ (% от CD8+ Т-клеток)
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель

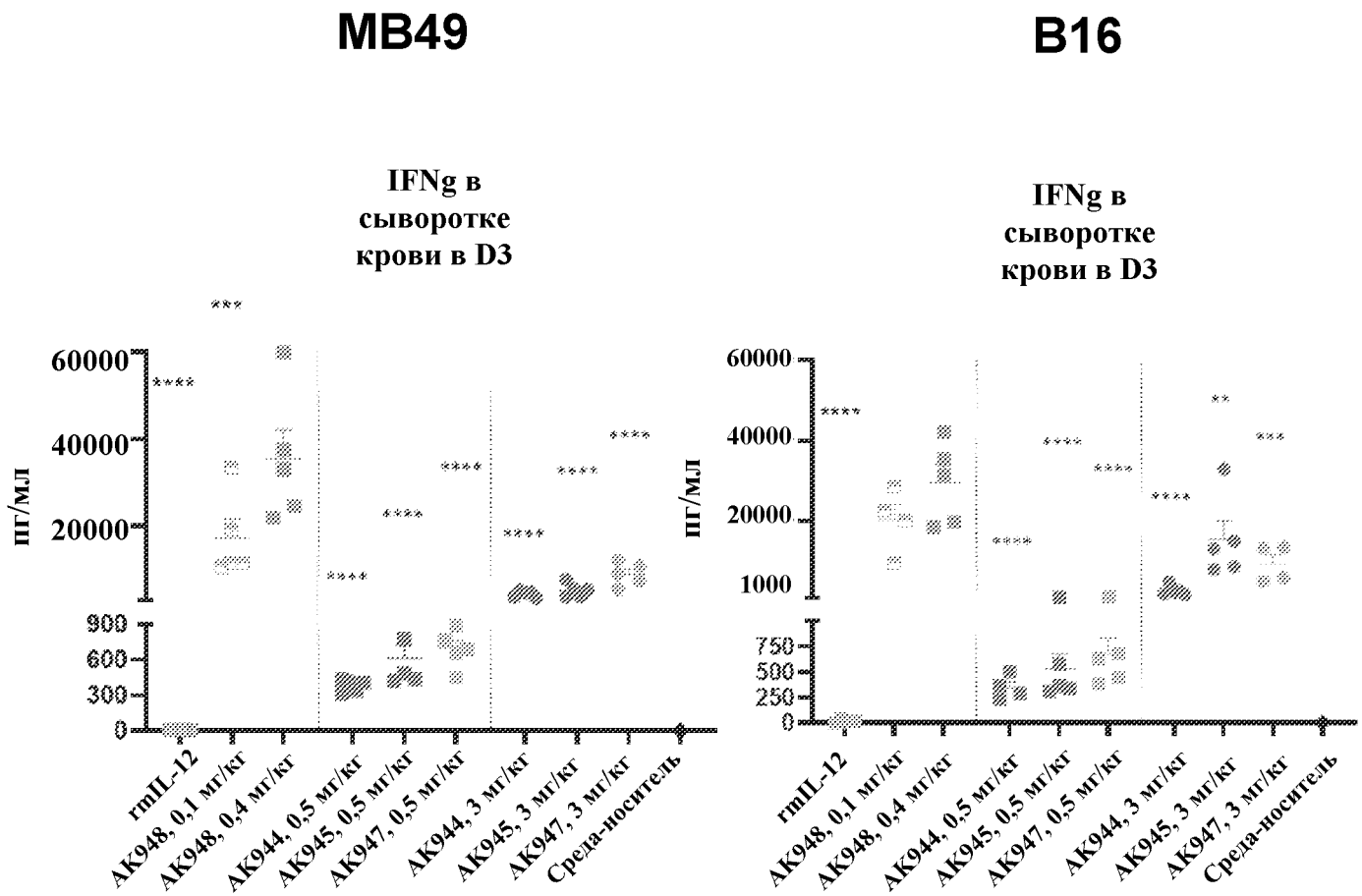
ФИГ. 65C

B16


ICOS+ CD8+ Т-клетки
Микроокружение опухоли
Кратность изменения
1 11 12 0 6,2 3,3 3,2 13 18
ICOS+ (% CD8+ Т-клеток)
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
Селезенка
ICOS+ CD8+ Т-клетки
0,6 6,4 5,1 0,8 0,7 0,7 0,9 2,4 2,1
ICOS+ (% CD8+ Т-клеток)
ICOS+ CD8+ Т-клетки
Кровь
0,4 7,2 7,6 1,7 10,9 2,8 4,7 4,3
ICOS+ (% CD8+)
ICOS+ CD8+ Т-клетки
Печень
1,3 6,8 8,7 2,0 1,7 2,8 2,2 5,5 2,8
ICOS+ (% CD8+ Т-клеток)


Активность ALT в сыворотке крови в D5, MB49
Предел выявления
нмоль/мин/мл
25
20
15
10
5
0
****
****
***
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
Активность ALT в сыворотке крови в D5, B16
нмоль/мин/мл
60
40
20
0
**
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель

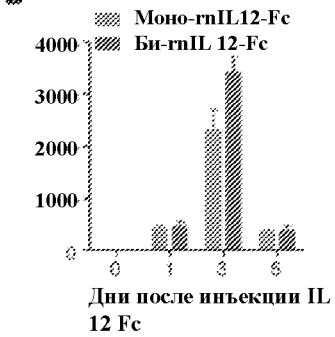
ФИГ. 66


MB49
IFNg в сыворотке крови в D3
пг/мл
60000
40000
20000
900
600
300
0
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
B16
IFNg в сыворотке крови в D3
пг/мл
60000
40000
20000
1000
750
500
250
0

ФИГ. 67А

Сыворотка крови

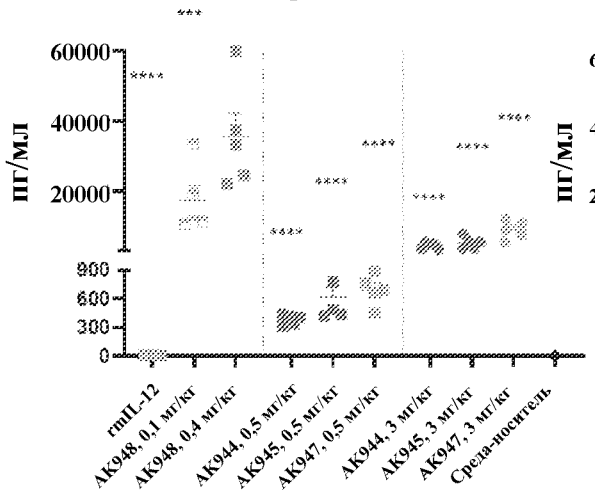
D



- Однократная доза (I.p)
- Белок mlL12-Fc
  Соответствует эквивалентному молярному количеству, соответствующему 1 мкг IL 12

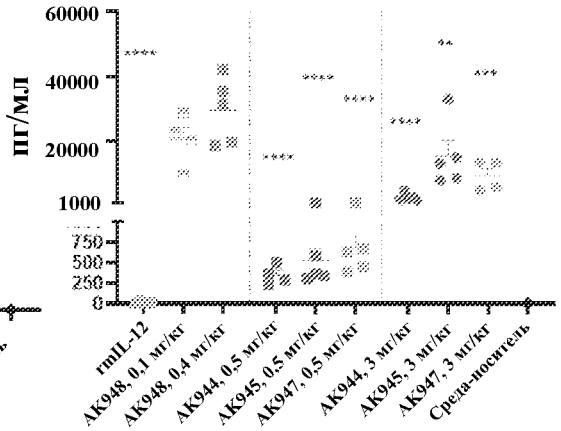
MB49

IFNg в сыворотке крови в D3



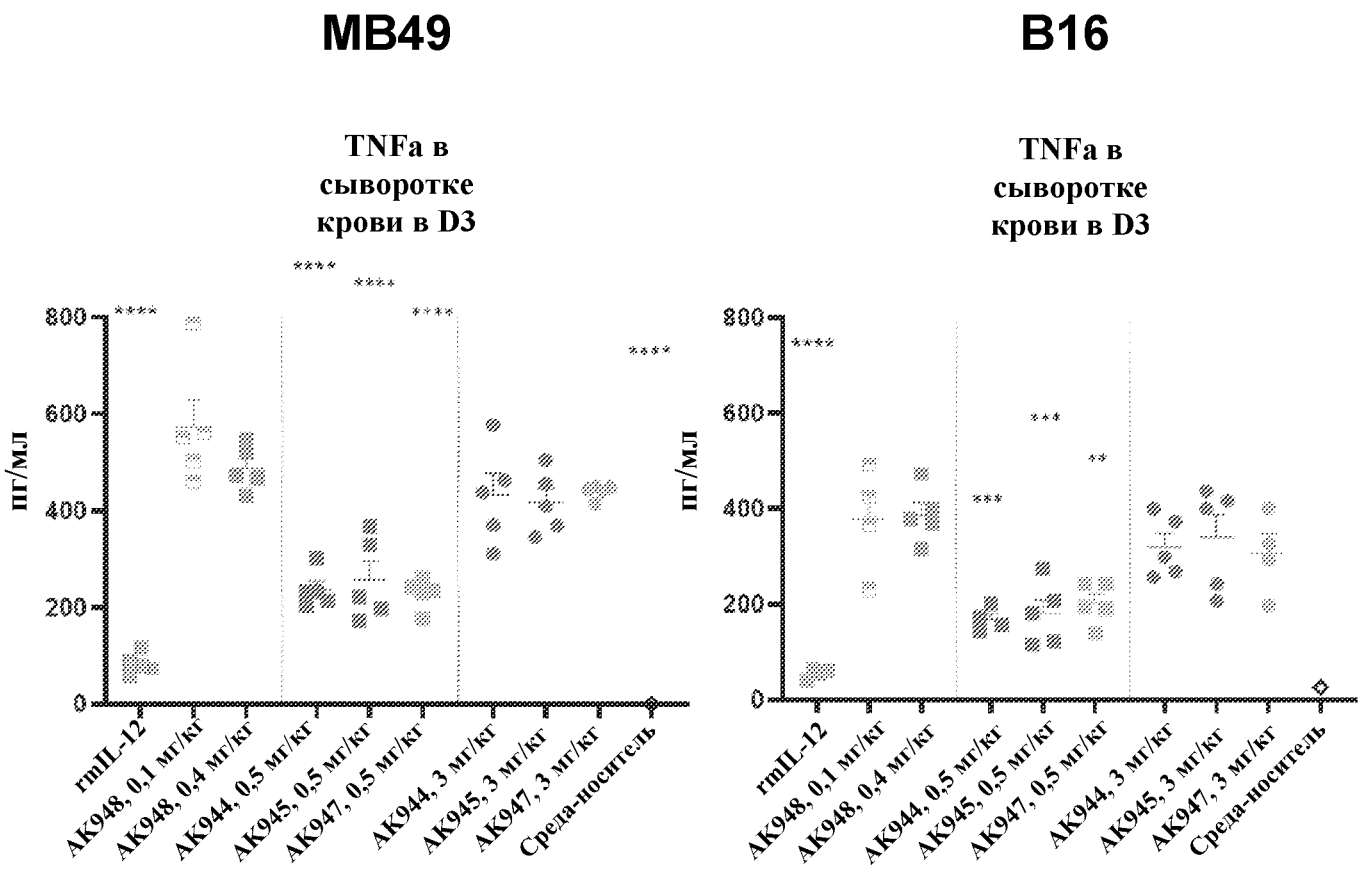
B16

IFNg в сыворотке крови в D3



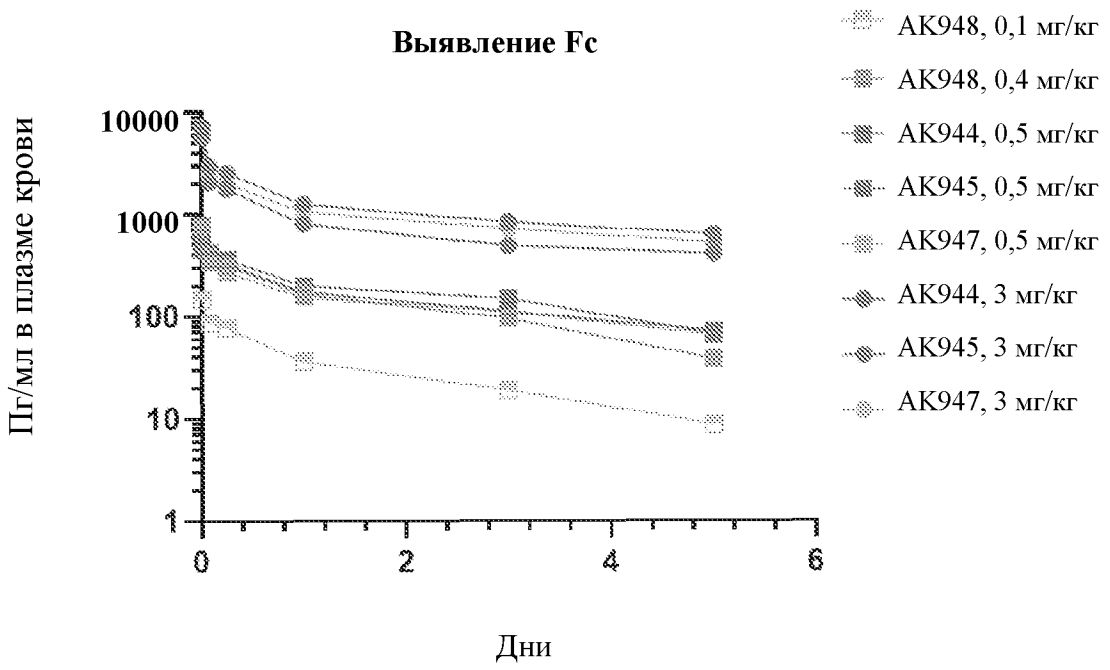
→Введение дозы в 10 раз выше (0,5 мг/кг), без индукции значительного повышения уровня IFNγ в сыворотке крови

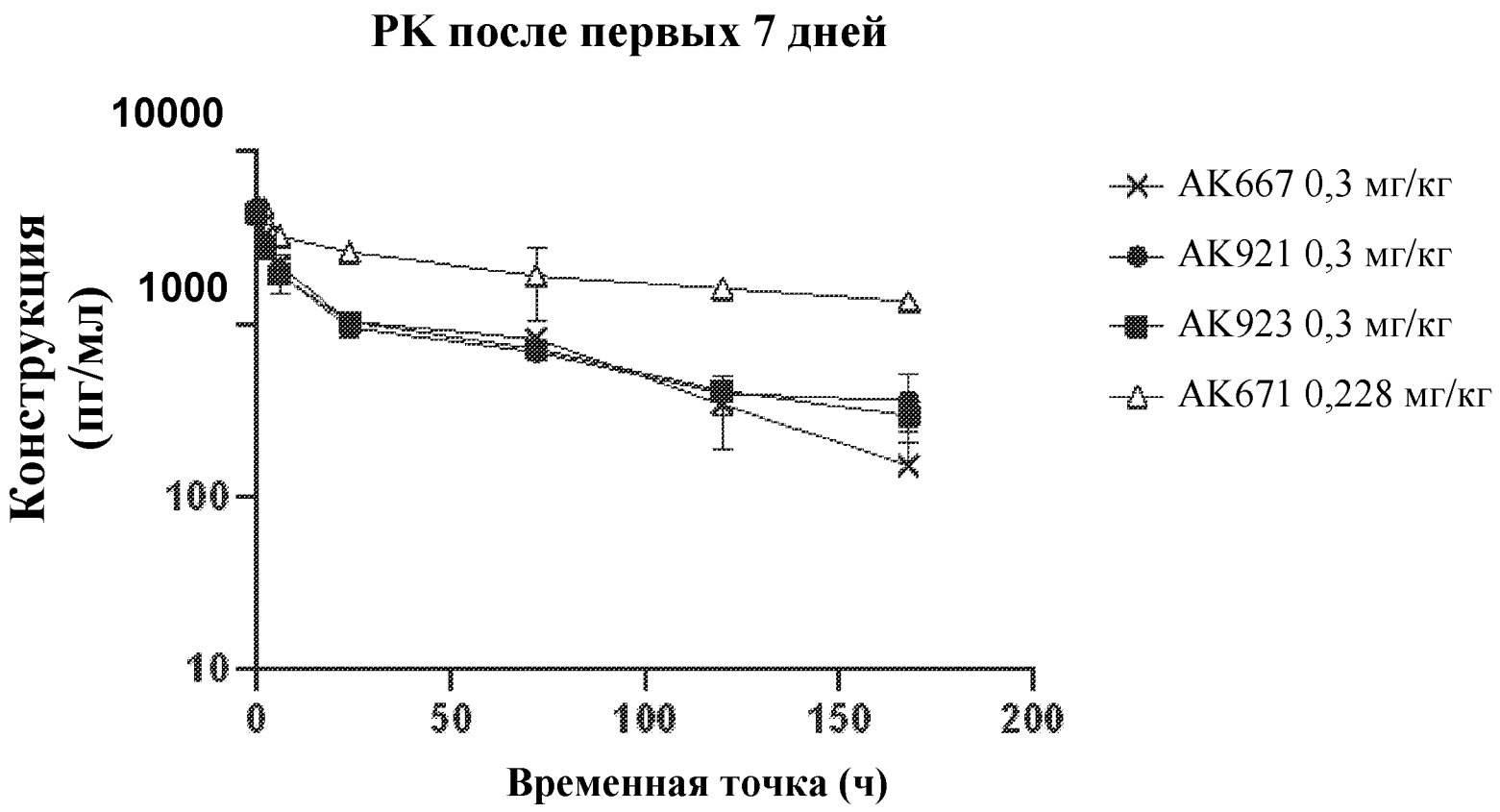
ФИГ. 67B


MB49
TNFa в сыворотке крови в D3
пг/мл
800
600
400
200
0
****
****
****
****
****
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель
B16
TNFa в сыворотке крови в D3
пг/мл
800
600
400
200
0
****
***
***
**
rmIL-12
АК948, 0,1 мг/кг
АК948, 0,4 мг/кг
АК944, 0,5 мг/кг
АК945, 0,5 мг/кг
АК947, 0,5 мг/кг
АК944, 3 мг/кг
АК945, 3 мг/кг
АК947, 3 мг/кг
Среда-носитель

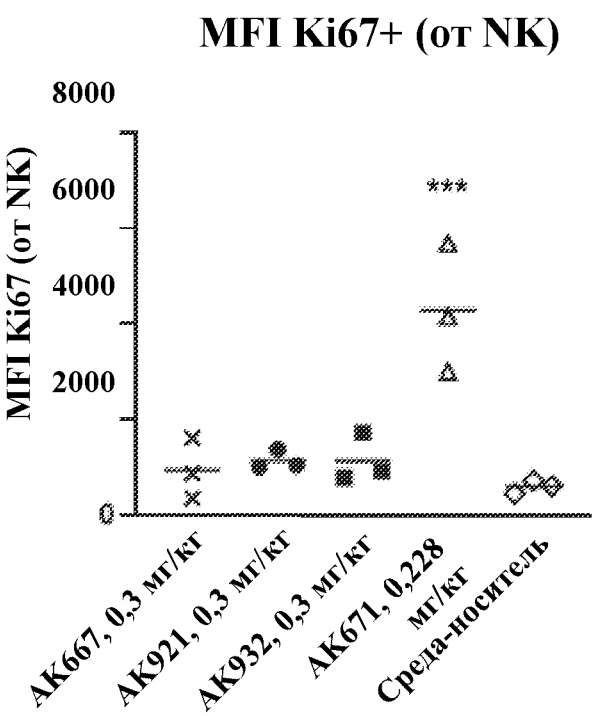
ФИГ. 67C

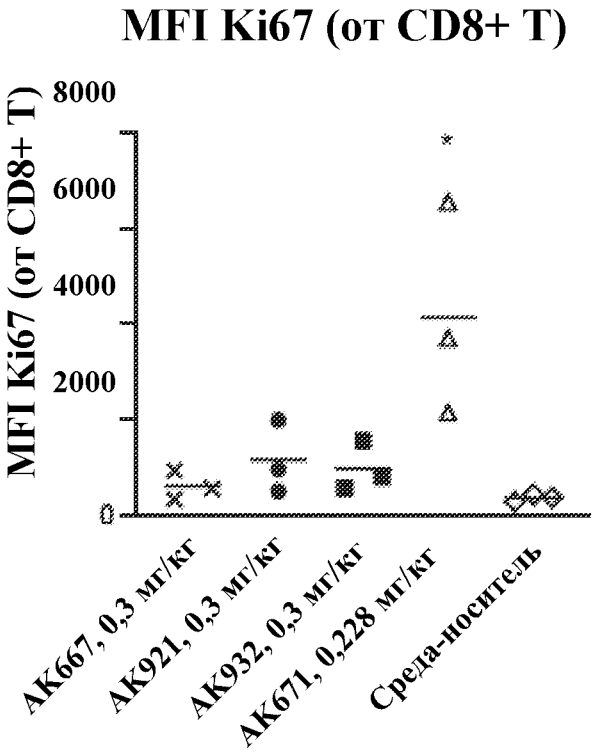
ФИГ. 68


Выявление Fc
Пг/мл в плазме крови
10000
1000
100
10
1
0
2
4
6
Дни
AK948, 0,1 мг/кг
AK948, 0,4 мг/кг
AK944, 0,5 мг/кг
AK945, 0,5 мг/кг
AK947, 0,5 мг/кг
AK944, 3 мг/кг
AK945, 3 мг/кг
AK947, 3 мг/кг


PK после первых 7 дней
Конструкция (пг/мл)
10000
1000
100
10
0
50
100
150
200
Временная точка (ч)
AK667 0,3 мг/кг
AK921 0,3 мг/кг
AK923 0,3 мг/кг
AK671 0,228 мг/кг

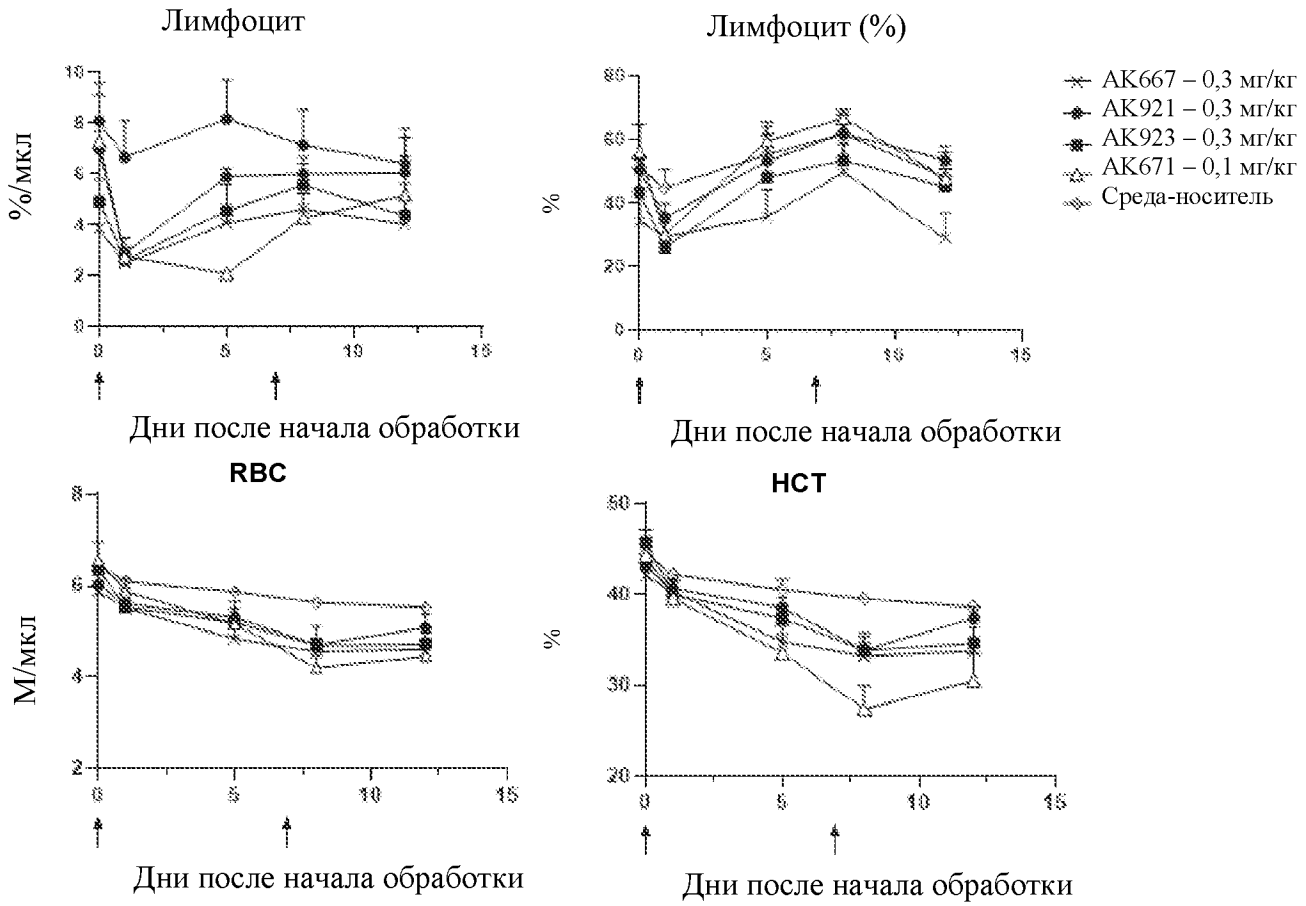
ФИГ. 69


MFI Ki67+ (от NK)
MFI Ki67 (от NK)
8000
6000
4000
2000
0
***
АК667, 0,3 мг/кг
АК921, 0,3 мг/кг
АК932, 0,3 мг/кг
АК671, 0,228 мг/кг
Среда-носитель

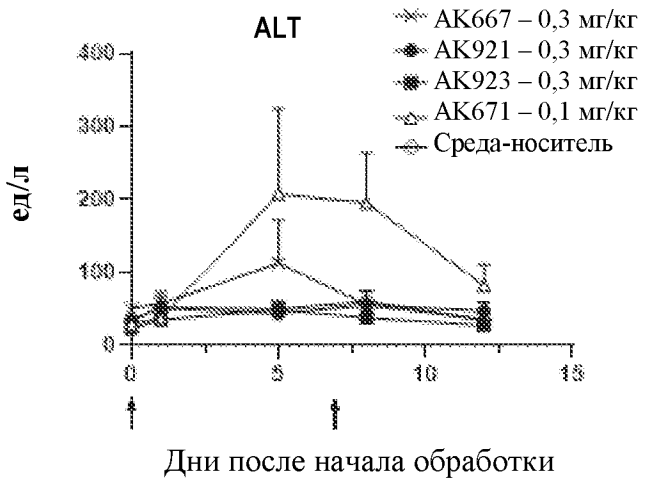

MFI Ki67 (от CD8+ T)
MFI Ki67 (от CD8+ T)
8000
6000
4000
2000
0
*
АК667, 0,3 мг/кг
АК921, 0,3 мг/кг
АК932, 0,3 мг/кг
АК671, 0,228 мг/кг
Среда-носитель

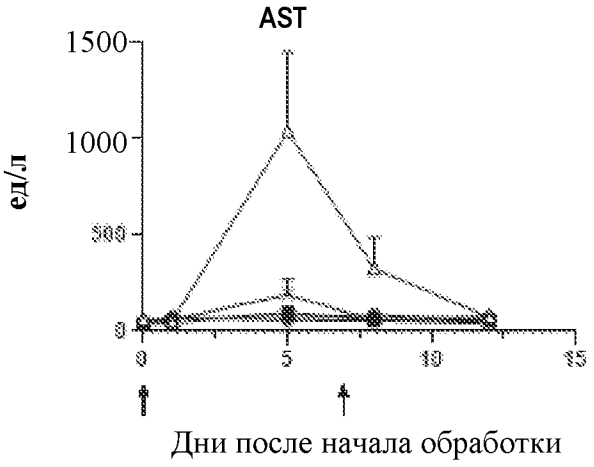
ФИГ. 70

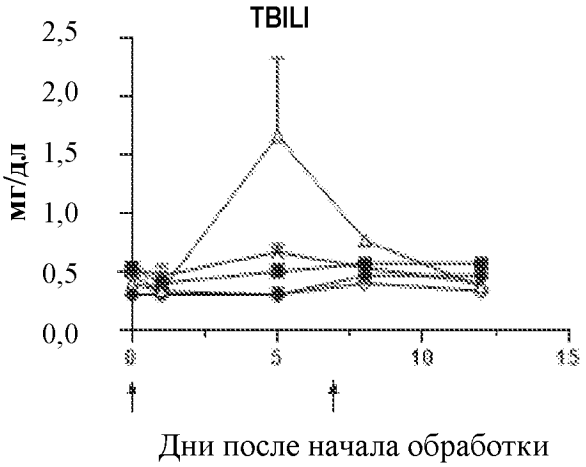
ФИГ. 71А


Лимфоцит
%/мкл
Дни после начала обработки
Лимфоцит (%)
%
Дни после начала обработки
AK667 – 0,3 мг/кг
AK921 – 0,3 мг/кг
AK923 – 0,3 мг/кг
AK671 – 0,1 мг/кг
Среда-носитель
RBC
М/мкл
Дни после начала обработки
HCT
%
Дни после начала обработки

ФИГ. 71B


ALT
AK667 – 0,3 мг/кг
AK921 – 0,3 мг/кг
AK923 – 0,3 мг/кг
AK671 – 0,1 мг/кг
Среда-носитель
ед/л
400
300
200
100
0
0
5
10
15
Дни после начала обработки


AST
ед/л
1500
1000
500
0
0
5
10
15
Дни после начала обработки


TBILI
мг/дл
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
5
10
15
Дни после начала обработки