



(51) МПК
C07K 14/54 (2006.01)
C12N 15/24 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2007125381/10, 08.12.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.12.2005

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
09.12.2004 US 60/634,470

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2009 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 27.12.2011 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2229305 C2, 27.05.2004. AHN J., Bos taurus IL-7 mRNA, complete cds, последовательность под № AF348422 размещена 02.12.2002 в БД «NCBI BLAST». BARHAM G.J. et al. Ovis aries interleukin-7 (IL-7) mRNA, complete cds, последовательность под № OAU10089 размещена 04.10.1995 в БД «NCBI BLAST». STOREK J. et al. Interleukin-7 (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 09.07.2007

(86) Заявка РСТ:
EP 2005/013145 (08.12.2005)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2006/061219 (15.06.2006)

Адрес для переписки:
191186, Санкт-Петербург, а/я 230, "АРС-ПАТЕНТ", пат.пов. И.И.Липатовой, рег.№ 554

(72) Автор(ы):

ДЖИЛЛИЗ Стивен Д. (US),
ВЭЙ Джеффри К. (US)

(73) Патентообладатель(и):

МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ (DE)

(54) ВАРИАНТЫ IL-7 СО СНИЖЕННОЙ ИММУНОГЕННОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к модификациям молекулы IL-7, и может быть использовано в медицине. Рекомбинантным путем получают слитый полипептид с активностью интерлейкина-7, содержащий модифицированную молекулу человеческого IL-7, в которой Т-клеточный эпитоп

модифицирован для снижения Т-клеточного ответа против IL-7, и участок Fc молекулы иммуноглобулина, слитый через свой С-конец с N-концом указанной модифицированной молекулы IL-7. Полученный полипептид используют в составе фармацевтической композиции для стимуляции иммунного ответа у пациента. Изобретение позволяет получить полипептид с активностью интерлейкина-7,

Аминокислотная последовательность IL-7 человека

**MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLLDISMKEI
GSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTIL
LNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKLNLDLCFLKRLLEIKTCWNKILM
GTKEH (SEQ ID NO:1)**

Фиг. 1

(56) (продолжение):

improves CD4 T-cell reconstitution after autologous CD34 cell transplantation in monkeys, Blood, 2003, v.101, n.10, p.4209-4218.

R U 2 4 3 7 8 9 3 C 2

R U 2 4 3 7 8 9 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 14/54 (2006.01)
C12N 15/24 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2007125381/10, 08.12.2005**
(24) Effective date for property rights:
08.12.2005
Priority:
(30) Priority:
09.12.2004 US 60/634,470
(43) Application published: **20.01.2009 Bull. 2**
(45) Date of publication: **27.12.2011 Bull. 36**
(85) Commencement of national phase: **09.07.2007**
(86) PCT application:
EP 2005/013145 (08.12.2005)
(87) PCT publication:
WO 2006/061219 (15.06.2006)
Mail address:
191186, Sankt-Peterburg, a/ja 230, "ARS-PATENT", pat.pov. I.I.Lipatovoj, reg.№ 554

(72) Inventor(s):
**DZhILLIZ Stiven D. (US),
VEhJ Dzheffri K. (US)**
(73) Proprietor(s):
MERK PATENT GMBKh (DE)

(54) **IL-7 VERSIONS WITH LOW IMMUNISING CAPACITY**

(57) Abstract:
FIELD: chemistry.
SUBSTANCE: recombinant technique is used to obtain a fused polypeptide with activity of interleukin-7, containing a modified human IL-7 molecule in which the T-cell epitope is modified to reduce T-cell response against IL-7, and the Fc part of an immunoglobulin molecule which is fused through its C-end with the N-end of said modified IL-7 molecule. The obtained polypeptide is used in a

pharmaceutical composition to stimulate immune response in a patient.

EFFECT: invention enables to obtain a polypeptide with interleukin-7 activity, having low immunising capacity.

8 cl, 43 dwg, 14 tbl, 12 ex

Аминокислотная последовательность IL-7 человека

**MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQDLLDSMKEI
GSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLKLVSEGTTIL
LNCTGQVKGRKPAALGEAQP~~TKS~~LEENKSLKEQKLNLCFLKRLLEIKETCWNKILM
GTKEH (SEQ. ID NO:1)**

Фиг. 1

RU 2 437 893 C2

RU 2 437 893 C2

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

5 В данной заявке заявлен приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 60/634470, поданной 9 декабря 2004, полное описание которой включено сюда путем ссылки на нее.

10 Область изобретения

Изобретение в целом относится к молекулам IL-7, модифицированным для снижения их иммуногенности. Эти молекулы также включают слитые белки, содержащие указанные модифицированные молекулы IL-7 и молекулы иммуноглобулина или их участки, особенно соответствующие Fc-слитые белки.

Предшествующий уровень техники

20 Цитокины представляют собой стимуляторы иммунной системы, и, таким образом, они полезны в качестве лекарств. Например, интерферон-альфа (IFN- α), интерферон-бета (IFN- β), интерлейкин-2 (IL-2) и гранулоцитарный/макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) все являются одобренными 25 лекарствами, применяемыми для лечения вирусных инфекций, рака, нарушения регуляции иммунной системы, такого как аутоиммунное заболевание, и для стимуляции восстановления иммунной системы после химиотерапии рака. К сожалению, эти белки могут стимулировать иммунный ответ против самих себя, вызывая развитие у пациентов антител против терапевтического белка. Эти антитела могут также ингибировать функцию такого же белка, продуцируемого 30 эндогенно у пациента, приводя в результате к возможным отдаленным последствиям для здоровья пациента.

35 Интерлейкин-7 представляет собой цитокин, который стимулирует выживание и пролиферацию Т-клеток, В-клеток и других иммунных клеток. Он также является потенциально терапевтическим белком для лечения пациентов, 40 иммунная система которых повреждена в результате химиотерапии рака, ВИЧ инфекции или других заболеваний, расстройств или химических воздействий. Однако на основании иммуностимуляторных свойств IL-7 ожидают, что при терапевтическом введении он индуцирует ответ антител против самого себя. 45 Поэтому в данной области техники существует необходимость в усовершенствованных вариантах IL-7, которые являются менее иммуногенными, но которые сохраняют свойство стимуляции иммунной системы.

50

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение направлено на интерлейкин-7 (IL-7), который модифицирован для снижения его иммуногенности по сравнению с IL-7 дикого типа. Более конкретно белки IL-7 по изобретению являются модифицированными так, что потенциальные эпитопы Т-клеток удалены. В результате этого белки IL-7, включая слитые белки иммуноглобулин-IL7, предпочтительно слитые белки Fc-IL7, по изобретению обладают улучшенными биологическими свойствами по сравнению с IL-7 дикого типа.

Соответственно, в одном аспекте изобретение представляет собой полипептид, который по меньшей мере на 80% идентичен молекуле человеческого IL-7 или ее активному участку, содержащий аминокислотную замену в одном или более чем одном участке, соответствующем Gln22, Leu24, Ile30, Phe39, Met54, Phe57, Arg58, Ala60, Leu63, Lys68, Met69, Leu77, Ile88, Val96, Leu104, Leu128, Met147, Thr149 или Lys150. Эти аминокислотные модификации можно использовать по отдельности или в комбинации, чтобы снизить Т-клеточный ответ против IL-7. Таким образом, изобретение охватывает IL-7-составляющие с, например, одной, по меньшей мере двумя, по меньшей мере четырьмя или по меньшей мере восьмью аминокислотными модификациями в положениях, выбранных из Gln22, Leu24, Ile30, Phe39, Met54, Phe57, Arg58, Ala60, Leu63, Lys68, Met 69, Leu77, Ile88, Val96, Leu104, Leu128, Met147, Thr149 и Lys150. В одном воплощении IL-7 составляющая включает одну, две, три, четыре, пять или более из приведенных ниже замен: Gln22Asp, Leu24Asp, Ile30Thr, Phe39Pro, Met54Ala, Phe57Lys, Phe57Asn, Arg58Asp, Ala60Ser, Arg61Glu, Leu77Asp, Leu104Ser, Leu104Val, Leu128Ala, Leu128Val, Leu128Pro, Leu128Ser, Met147Lys, Thr149Ser или Lys150Stop.

В одном воплощении полипептид содержит замену или замены в одном или более чем одном из Phe39, Phe57, Leu77 и Leu128. В следующем воплощении полипептид имеет одну или более чем одну замену Phe39Pro, Phe57Asn, Leu77Asp и Leu128Ser. В другом воплощении полипептид включает замены Phe39Pro, Phe57Asn, Leu77Asp и Leu128Ser, тогда как в следующем воплощении полипептид включает замены Phe39Pro, Phe57Asn и Leu128Ser.

Предпочтительными заменами согласно данному изобретению являются замены при положениях:

Phe39, либо Phe57, либо Leu77, либо Leu128;

Phe39 и Phe57, либо Phe39 и Leu77, либо Phe57 и Leu77, либо Phe39 и Leu128, либо Phe57 и Leu128, либо Leu77 и Leu128;

Phe39 и Phe 57 и Leu77, либо Phe39 и Phe57 и Leu128, либо Phe57 и Leu77 и Leu128, либо Phe39 и Leu77 и Leu128;

Phe39 и Phe57 и Leu77 и Leu128.

Предпочтительными конкретными заменами согласно данному изобретению являются:

Phe39Pro, либо Phe57Lys, либо Leu77Asp, либо Leu128Ser;

Phe39Pro и Phe57Lys, либо Phe39Pro и Leu77Asp, либо Phe57Lys и Leu77Asp, либо Phe39Pro и Leu128Ser, либо Phe57Lys и Leu128Ser, либо Leu77Asp и Leu128Ser;

Phe39Pr и Phe 57Lys и Leu77Asp, либо Phe39Pro и Phe57Lys и Leu128Ser, либо

Phe57Lys и Leu77Asp и Leu128Ser, либо Phe39Pro и Leu77Asp и Leu128Ser; Phe39Pro и Phe 57Lys и Leu77Asp и Leu128Ser.

В некоторых воплощениях изобретения полипептид с составляющей, на по меньшей мере 80% идентичной человеческому IL-7, дополнительно содержит иммуноглобулиновую (Ig) составляющую, такую как составляющая человеческого Ig. В одном воплощении Ig составляющая представляет собой IgG2. В некоторых воплощениях Ig составляющая представляет собой Fc участок. Изобретение также относится к клетке, содержащей нуклеиново-кислотную последовательность, кодирующую полипептид, модифицированный согласно изобретению. В одном воплощении клетка представляет собой прокариотическую клетку.

В следующем воплощении полипептид имеет по меньшей мере 90% идентичности составляющей человеческого IL-7 или его активному участку, тогда как в другом воплощении полипептид имеет по меньшей мере 95% идентичности составляющей человеческого IL-7 или его активному участку.

Изобретение также относится к способу лечения пациента, при котором пациенту вводят терапевтически эффективное количество полипептида по изобретению, причем у пациента, например, диагностирован рак или ВИЧ,. В одном воплощении в изобретении предложено введение между примерно 0,01 и примерно 10 мг/кг/сутки или между 0,01 и 10,00 мг/кг/сутки полипептида по изобретению.

Краткое описание графических материалов

На фиг.1 изображена аминокислотная последовательность для человеческого IL-7. Сигнальная последовательность указана жирным шрифтом.

Жирным шрифтом и курсивом также указан отрезок из восемнадцати аминокислот, который может быть делетирован из последовательности IL-7.

5 На фиг.2 изображена аминокислотная последовательность для бычьего IL-7. Сигнальная последовательность указана жирным шрифтом.

На фиг.3 изображена аминокислотная последовательность для овечьего IL-7. Сигнальная последовательность указана жирным шрифтом.

10 На фиг.4 изображена аминокислотная последовательность примерного деиммунизированного человеческого IL-7, где последовательности Т-клеточных эпитопов модифицированы.

15 На фиг.5 изображена аминокислотная последовательность продуцируемого бактериями деиммунизированного человеческого IL-7.

20 На фиг.6 изображена нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая зрелый IL-7, в которую включены кодоны для мутаций F39P, F57N и L128S.

На фиг.7 изображена аминокислотная последовательность зрелого IL-7 с мутациями F39P, F57N и L128S.

25 На фиг.8 изображена нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая зрелый IL-7, в которую включены кодоны для мутаций F39P, F57N, L77D и L128S.

30 На фиг.9 изображена аминокислотная последовательность зрелого IL-7 с мутациями F39P, F57N, L77D и L128S.

35 На фиг.10 изображена нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая продуцируемый бактериями деиммунизированный IL-7 (bDeI-IL-7), оптимизированный по кодонам для *E. coli*, с кодонами для аминокислотных мутаций K68D, M69D, I88T, V96G.

40 На фиг.11 изображена нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая зрелый вариант IL-7, деиммунизированный IL-7 (DeI-IL-7), с кодонами для аминокислотных мутаций K68D, M69D, I88T, V96G.

На фиг.12 изображена аминокислотная последовательность Fc γ 1-IL-7, где участок Fc состоит из шарнирной области γ 1, γ 1 CH2 и γ 1 CH3 области.

45 На фиг.13 изображена аминокислотная последовательность человеческого Fc γ 2(h)(FN>AQ)-IL-7, которая представляет собой участок Fc с шарнирной областью γ 1, доменом γ 2 CH2 и доменом γ 2 CH3. В участок Fc включены аминокислотные мутации F296A и N297Q.

50 На фиг.14 изображена аминокислотная последовательность человеческого Fc γ 1-(линкер1)-IL-7, которая представляет собой участок Fc, состоящий из

шарнирной области $\gamma 1$, CH1 и CH2 области, соединенной с IL-7-составляющей посредством полипептидного линкера из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGS.

5 На фиг.15 изображена аминокислотная последовательность человеческого Fc $\gamma 1$ (YN>AQ)-(линкер 2)-IL-7, которая представляет собой участок $\gamma 1$ Fc с шарнирной областью $\gamma 1$, CH1 и CH2 областью, в который включены мутации Y296A и N297Q, соединенный с IL-7-составляющей посредством полипептидного линкера из аминокислотной последовательности GGGGSGGGG.

10 На фиг.16 изображена аминокислотная последовательность человеческого Fc $\gamma 1$ (YN>AQ,d)-(линкер 2)-IL-7, которая представляет собой участок $\gamma 1$ Fc с шарнирной областью $\gamma 1$, CH1 и CH2 доменами, в который включены мутации Y296A и N297Q, а также делеция С-концевого лизина и предшествующего глицина составляющей Fc. Участок Fc соединен с IL-7-составляющей посредством полипептидного линкера из аминокислотной последовательности GGGGSGGGG.

20 На фиг.17 изображена нуклеиново-кислотная последовательность Fc $\gamma 1$, участок Fc с шарнирной областью, CH1 доменом и CH2 доменом, все от IgG1.

25 На фиг.18 изображена нуклеиново-кислотная последовательность Fc $\gamma 1$ (YN>AQ), которая представляет собой участок Fc с шарнирной областью, CH1 доменом и CH2 доменом, все от IgG1. В участок Fc включены мутации Tyr296Ala и Asn297Gln.

30 На фиг.19 изображена нуклеиново-кислотная последовательность Fc $\gamma 2$ (h), которая представляет собой участок Fc с шарнирной областью IgG1 и CH2 и CH3 доменами IgG2.

35 На фиг.20 изображена нуклеиново-кислотная последовательность Fc $\gamma 2$ (h)(FN>AQ), которая представляет собой участок Fc с шарнирной областью IgG1 и CH2 и CH3 доменами IgG2. В участок Fc включены мутации F296A и N297Q.

40 На фиг.21 изображена аминокислотная последовательность зрелого человеческого деиммунизированного IL-7.1, где в IL-7 включены замены L24D, M54A, F57K, A60S, R61E, M147K, T149S и делетированы остатки K150, E151 и H152.

45 На фиг.22 изображена нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность фиг. 21.

50 На фиг.23 изображена аминокислотная последовательность зрелого человеческого деиммунизированного IL-7.2, в которую включены замены D76N, L77D, T87Q, I88T, V96G, L119S, L128V, M147K, T149S и делетированы K150, E151, и H152.

На фиг.24 изображена нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность фиг. 23.

5 На фиг.25 изображена аминокислотная последовательность зрелого человеческого деиммунизированного IL-7.3, в которую включены замены L24D, I30T, F39P, M54A, F57K, A60S, R61E, M68D, N69D, L77D, T87Q, I88T, V96G, L119S, L128A, M147K, T149S и делетированы K150, E151 и H152.

10 На фиг.26 изображена нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность фиг. 25.

15 На фиг.27 изображена нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая линкерную последовательность GGGGSGGGG, за которой следует зрелый человеческий IL-7, содержащий аминокислотную замену F39P, F57N и L128S (PNS), и которая содержит фланкирующие сайты рестрикции Xma I и Xho I при 5' и 3' концах соответственно.

20 На фиг.28 изображена нуклеиново-кислотная последовательность зрелого huFcγ2(h)(FN>AQ)(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S), которая представляет собой участок человеческого Fc с шарнирной областью IgG1 и CH2 и CH3 доменами IgG2, в который включены мутации F296A и N297Q, соединенный с N-концом составляющей человеческого IL-7, в которую включены мутации F39P, F57N, L77D и L128S. Участок Fc и IL-7-составляющая соединены линкерной последовательностью GGGGSGGGG.

30 На фиг.29 изображена нуклеиново-кислотная последовательность зрелого huFcγ2(h)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S), которая представляет собой участок человеческого Fc с шарнирной областью IgG1 и CH2 и CH3 доменами IgG2, соединенный с N-концом составляющей человеческого IL-7, в которую включены мутации F39P, F57N, L77D и L128S. Участок Fc и IL-7-составляющая соединены линкерной последовательностью GGGGSGGGG.

40 На фиг.30 изображена нуклеиново-кислотная последовательность зрелого huFcγ2(h)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L128S), которая представляет собой участок человеческого Fc с шарнирной областью IgG1 и CH2 и CH3 доменами IgG2, соединенный с N-концом составляющей человеческого IL-7, в которую включены мутации F39P, F57N и L128S. Участок Fc и IL-7-составляющая соединены линкерной последовательностью GGGGSGGGG.

45 На фиг.31 изображена аминокислотная последовательность зрелого huFcγ2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L128S), которая представляет собой участок человеческого Fc с шарнирной областью IgG1 и CH2 и CH3 доменами IgG2. Участок Fc содержит мутации F296A и N297Q. Участок Fc сшит с IL-7-

составляющей посредством линкера последовательности GGGGSGGGG. IL-7-составляющая содержит мутации F39P, F57N и L128S.

5 На фиг.32 изображена аминокислотная последовательность зрелого huFc γ 2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S), которая представляет собой участок человеческого Fc с шарнирной областью IgG1 и CH2 и CH3 доменами IgG2. Участок Fc содержит мутации F296A и N297Q. Участок Fc сшит с IL-7-составляющей посредством линкера последовательности GGGGSGGGG. IL-7-составляющая содержит мутации F39P, F57N, L77D и L128S.

10 На фиг.33 изображена аминокислотная последовательность зрелого huFc γ 2(h)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S), которая представляет собой участок человеческого Fc с шарнирной областью IgG1 и CH2 и CH3 доменами IgG2. Участок Fc сшит с IL-7-составляющей посредством линкера последовательности GGGGSGGGG. IL-7-составляющая содержит мутации F39P, F57N, L77D и L128S.

15 На фиг.34 изображена аминокислотная последовательность зрелого huFc γ 2(h) (линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L128S), которая представляет собой участок человеческого Fc с шарнирной областью IgG1 и CH2 и CH3 доменами IgG2. Участок Fc сшит с IL-7-составляющей посредством линкера последовательности GGGGSGGGG. IL-7-составляющая содержит мутации F39P, F57N, L77D and L128S.

20 Фиг. 35 представляет собой выравнивание аминокислотных последовательностей белков IL-7 из разных источников: человека, шимпанзе, павиана, макаки, быка, свиньи, овцы, крысы и мыши.

25 На фиг.36 изображены концентрации Fc-IL-7 в плазме в мкг/мл как для испытуемых, так и для контрольных мышей, которым вводили Fc-IL-7 подкожно.

30 На фиг.37 показаны средние значения кратности изменения концентраций Fc-IL-7 в плазме между сутками 0 и сутками 2 и между сутками 2 и 4 у испытуемых мышей, которым вводили Fc-IL-7 подкожно (SC).

35 На фиг.38 изображены средние массы органов, взятых у испытуемых мышей, умерщвленных на сутки 7, по сравнению со средними массами органов мышей в контрольной группе.

40 На фиг.39 изображено сравнение частоты гранулоцитов Gr-1+ в клетках/мкл в периферической крови мышей из контрольной группы, группы дозировки 0,5 мг/кг, группы дозировки 5,0 мг/кг и группы дозировки 25 мг/кг на сутки 7.

45 На фиг.40 изображено сравнение частоты клеток CD19+ в клетках/мкл в периферической крови мышей из контрольной группы, группы дозировки 0,5 мг/кг, группы дозировки 5,0 мг/кг и группы дозировки 25 мг/кг на сутки 7.

На фиг.41 изображено сравнение частоты клеток CD4+ в клетках/мкл в периферической крови мышей из контрольной группы, группы дозировки 0,5 мг/кг, группы дозировки 5,0 мг/кг и группы дозировки 25 мг/кг на сутки 7.

На фиг.42 изображено сравнение частоты клеток CD8+ в клетках/мкл в периферической крови мышей из контрольной группы, группы дозировки 0,5 мг/кг, группы дозировки 5,0 мг/кг и группы дозировки 25 мг/кг на сутки 7.

На фиг.43 изображена активность Fc-IL-7 по сравнению с IL-7 дикого типа на основании включения меченого тритием тимидина в импульсах в минуту против концентрации IL-7/Fc-IL-7 в стандартном анализе клеточной пролиферации.

Подробное описание изобретения

Изобретение направлено на белки IL-7, которые обладают сниженной иммуногенностью по сравнению с IL-7 дикого типа, а также на способы получения и применения таких белков. Более конкретно в изобретении предложены мутации внутри IL-7-составляющих, которые обладают эффектом снижения иммуногенности самого IL-7, прежде всего в результате удаления Т-клеточных эпитопов внутри IL-7, которые могут стимулировать иммунный ответ. Изобретение также охватывает слитые белки, включающие IL-7-составляющие, модифицированные в соответствии с положениями изобретения.

Т-клеточные эпитопы можно идентифицировать с помощью ряда компьютерных и некомпьютерных методов, включая прогнозы, основанные на компьютерном моделировании структуры, либо с помощью синтеза пептидов и тестирования их на связывание со специфичными молекулами МНС (главного комплекса гистосовместимости) класса II или в анализе на иммуногенность. Согласно изобретению потенциальный Т-клеточный эпитоп представляет собой последовательность, для которой при рассмотрении ее в качестве изолированного пептида прогнозируется, что она связывается с молекулой МНС класса II или ее эквивалентом у видов, не представляющих собой человека. Потенциальный Т-клеточный эпитоп определен без учета других аспектов процессинга антигена, таких как эффективность захвата белка в антигенпрезентирующие клетки, эффективность расщепления в сайтах в интактном белке с образованием пептида, который может связаться с МНС класса II и так далее. Таким образом, набор Т-клеточных эпитопов, которые действительно представлены на МНС класса II после введения белка животному, представляет собой подгруппу потенциальных Т-клеточных эпитопов. Согласно изобретению Т-клеточный эпитоп представляет собой эпитоп на белке, который взаимодействует с молекулой МНС класса II. Не

связываясь теорией, понятно, что Т-клеточный эпитоп представляет собой аминокислотную последовательность в белке, которая неспособна претерпевать процесс негативной Т-клеточной селекции во время развития Т-клеток и, следовательно, можно ожидать, что она будет представлена на молекуле МНС класса II и распознана Т-клеточным рецептором.

В-клеточные эпитопы также идентифицируют с помощью ряда компьютерных и некомпьютерных методов, включая прогнозы, основанные на компьютерном моделировании структуры, либо с помощью синтеза пептидов и тестирования их на связывание со специфичными молекулами В-клеточных рецепторов антигена или в анализе на иммуногенность. Согласно изобретению потенциальный В-клеточный эпитоп представляет собой последовательность, для которой при рассмотрении ее в качестве изолированного пептида прогнозируется, что она связывается с В-клеточным рецептором антигена или его эквивалентом у видов, не представляющих собой человека. В-клеточный эпитоп представляет собой эпитоп, который связывается или распознается В-клеточным рецептором антигена и составляет подгруппу потенциальных В-клеточных эпитопов.

В изобретении предложены способы, относящиеся к снижению иммуногенности IL-7. Согласно одному воплощению изобретения потенциальные не собственные Т-клеточные эпитопы идентифицируют в последовательностях IL-7. Например, потенциальные не собственные Т-клеточные эпитопы идентифицируют с помощью компьютерных методов, основанных на моделировании связывания пептида с молекулами МНС класса II. Затем получают замены, так чтобы способность пептидов, содержащих потенциальные Т-клеточные эпитопы, к связыванию с МНС класса II была снижена или элиминирована. Этот процесс идентификации и модификации пептидов, которые связываются с МНС класса II, называют "деиммунизацией", и полученные в результате модифицированные белковые молекулы называют "деиммунизированными".

Согласно изобретению связывание с МНС класса II можно исключить в ситуациях, когда белок следует продуцировать в бактериях или в организме, который не образует паттерн гликозилирования млекопитающих, таком как дрожжи или клетки насекомых.

В изобретении предложены некомпьютерные способы снижения или элиминации числа Т-клеточных эпитопов в IL-7, не требующие разработки компьютерных моделей или трехмерных белковых структур. В одном воплощении способ по изобретению использует преимущество того факта, что внутренний

5 сегмент из девяти аминокислот взаимодействует как с молекулой МНС класса II, так и с Т-клеточным рецептором во время презентации антигена. Самая N-концевая аминокислота, "якорное" положение, связывается с глубоким карманом
10 внутри молекулы МНС класса II. Одна из приведенных ниже аминокислот типично присутствует в якорном положении, которое важно для связывания с молекулой МНС класса II: лейцин, валин, изолейцин, метионин, фенилаланин, тирозин и триптофан. Согласно изобретению дополнительные 2-3 аминокислоты, соседние с
15 внутренними 9 аминокислотами, также влияют на взаимодействие с молекулами МНС.

15 Общий способ по изобретению включает мутирование любых лейцинов, валинов, изолейцинов, метионинов, фенилаланинов, тирозинов или триптофанов, которые встречаются в IL-7. В одном воплощении одну или более чем одну из этих аминокислот в кандидате на Т-клеточный эпитоп мутируют до треонина, аланина
20 или пролина, сохраняя, таким образом, некоторую гидрофобную природу аминокислоты, которую заменяют. В следующих воплощениях изобретения одну или более чем одну из вышеупомянутых аминокислот делетируют из кандидата на Т-клеточный эпитоп или потенциального Т-клеточного эпитопа или заменяют
25 аналогом соответствующей аминокислоты. Согласно изобретению, если аминокислоту делетируют, чтобы разрушить потенциальный Т-клеточный эпитоп, следует заботиться о том, чтобы не образовать новый Т-клеточный эпитоп, который включает аминокислоты рядом с делецией.

30 Таким образом, в изобретении предложены нуклеиново-кислотные последовательности и белки, которые полезны при конструировании менее иммуногенных белков IL-7. Конкретно в изобретении предложены белки с мутациями лейцинов, валинов, изолейцинов, метионинов, фенилаланинов, тирозинов или триптофанов. Любой алифатический или ароматический остаток
35 (лейцин, валин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан или тирозин) представляет высокий риск образования МНС-связывающего пептида с аминокислотой в первом положении (якорном положении), которая связывается с карманом молекулы МНС. Следовательно, замена любой из вышеупомянутых аминокислот аминокислотой, которая не представляет собой одну из
40 вышеупомянутых аминокислот, или аланином, пролином или треонином, будет удалять кандидат на Т-клеточный эпитоп.

45 Белки могут представлять собой человеческие белки с последовательностями, которые в целом соответствуют последовательностям, обнаруживаемым в организме человека. В изобретении также предложены
50

нуклеиново-кислотные последовательности, кодирующие такие белки. Эти нуклеиново-кислотные последовательности для данного аспекта изобретения могут существовать в виде плазмид, фрагментов, образованных в результате ПЦР, или нуклеиновых кислот, полученных с помощью химического синтеза.

Как используют здесь, термин "интерлейкин-7" или "IL-7" означает полипептиды IL-7, а также их производные и аналоги, имеющие существенную идентичность аминокислотной последовательности со зрелым IL-7 дикого типа млекопитающих. Например, IL-7 относится к аминокислотной последовательности рекомбинантного или не рекомбинантного полипептида, имеющего аминокислотную последовательность: i) нативного или встречающегося в природе аллельного варианта полипептида IL-7, ii) биологически активного фрагмента полипептида IL-7, iii) биологически активного полипептида-аналога полипептида IL-7 или iv) биологически активного варианта полипептида IL-7.

Полипептиды IL-7, модифицированные согласно изобретению, могут иметь происхождение из любых видов, например: человека, быка или овцы. Нуклеиново-кислотные и аминокислотные последовательности IL-7 хорошо известны в данной области техники. Например, аминокислотная последовательность человеческого IL-7 имеет номер по каталогу Genbank NM 000880 (SEQ ID NO:1) и показана на фиг.1; аминокислотная последовательность мышиноного IL-7 имеет номер по каталогу Genbank NM 008371; аминокислотная последовательность крысиного IL-7 имеет номер по каталогу Genbank AF 367210; аминокислотная последовательность бычьего IL-7 имеет номер по каталогу Genbank NM 173924 (SEQ ID NO:2) и показана на фиг.2; и аминокислотная последовательность овечьего IL-7 имеет номер по каталогу Genbank U10089 (SEQ ID NO:3) и показана на фиг.3. Сигнальная последовательность для каждого вида полипептида показана жирным шрифтом на каждой из фигур и типично не включена, когда участок IL-7 слит С-концом с белком-носителем.

Кроме того, на фиг.35 показано выравнивание различных последовательностей IL-7 млекопитающих. IL-7 из приматов, не представляющих собой человека, в целом более чем на 90% идентичен человеческому IL-7. Хотя последовательность мышиноного IL-7 является наиболее отличной от последовательности человеческого IL-7 с менее чем 70% идентичностью, она, тем не менее, способна активировать рецептор человеческого IL-7. Следовательно, IL-7-составляющие из ряда видов особенно полезны в соответствии с положениями изобретения.

“Вариант” белка IL-7 определяют как аминокислотную последовательность IL-7, которая изменена по одной или более чем одной аминокислоте по сравнению с IL-7 дикого типа. Вариант может иметь “консервативные” замены, где замененная аминокислота обладает схожими структурными или химическими свойствами, например замену лейцина изолейцином. Реже вариант может иметь “неконсервативные” замены, например замену глицина триптофаном. Схожие минорные вариации могут также включать делеции или инсерции аминокислот, либо и то, и другое.

Варианты белка IL-7 также включают полипептиды, которые имеют по меньшей мере примерно 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с IL-7 дикого типа. Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновых кислот последовательности выравнивают в целях оптимального сравнения (например можно вводить гэпы в последовательность первой аминокислотной или нуклеиново-кислотной последовательности для оптимального выравнивания со второй аминокислотной или нуклеиново-кислотной последовательностью). Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений, общих для последовательностей (то есть % гомологии = (число идентичных положений/суммарное число положений)100 раз). Определение процента гомологии между двумя последовательностями можно осуществить, используя математический алгоритм. Не ограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264-68, модифицированный, как в статье Karlin and Altschul, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-77. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol., 215: 403-10. Поиск нуклеотидов BLAST можно проводить с помощью программы NBLAST, баллы=100, длина шага=12. Поиск белков BLAST можно проводить с помощью программы XBLAST, баллы=50, длина шага=3. Для получения выравниваний с гэпами в целях сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Research, 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры соответствующих программ по умолчанию (например XBLAST и NBLAST).

Кроме того, изобретение также включает слитые белки IL-7, где IL-7-составляющая содержит делецию, и которые сохраняют сравнимую активность по

сравнению с соответствующими не модифицированными слитыми белками IL-7. Например, в изобретении предложена форма Ig-IL-7 или IL-7, в которой IL-7-составляющая содержит внутреннюю делецию восемнадцати аминокислот, соответствующую последовательности VKGRKPAALGEAQPTKSL (SEQ ID NO:46), или человеческий IL-7 дикого типа (см. SEQ ID NO:1). Кроме того, в изобретении предложена активная форма IL-7, где Lys150 делетирован. Glu151 и His152 могут быть также делетированы в сочетании с Lys150, причем активная форма IL-7 все еще остается.

На протяжении всей заявки положения аминокислотных остатков в последовательности IL-7 даны по отношению к зрелому человеческому белку IL-7. Например, цистеин в N-концевой последовательности MDCDIEGK...(SEQ ID NO:47) продуцируемого бактериями человеческого белка IL-7, в которую включен стартовый метионин, все же называют Cys2.

Модифицирование белков IL-7

Один аспект изобретения является следствием понимания того, что IL-7, продуцируемый путем бактериальной экспрессии, не будет содержать посттрансляционных модификаций, которые характерны для эукариот, таких как млекопитающие. Например, IL-7 содержит три предсказанных N-сшитых сайта гликозилирования в положениях 70, 91 и 116. В слитом белке Fc-IL-7, экспрессируемом в клетках млекопитающих, аспарагины в положениях 70 и 91 гликозилированы, тогда как аспарагин в положении 116 не гликозилирован. Вероятно, что IL-7, продуцируемый эндогенно в организме человека, также является N-гликозилированным, по меньшей мере в положениях 70 и 91, и, возможно, в положении 116. Эти N-сшитые гликозилирования отсутствуют в продуцируемом бактериями IL-7 и представляют собой последовательности, которые могут распознаваться иммунной системой человека как "не свое", то есть не присутствующее в норме в организме человека. Как таковое изобретение охватывает деиммунизацию этих потенциальных областей эпитопов на IL-7 для снижения иммуногенности IL-7 и родственных белков.

Согласно изобретению в IL-7 присутствуют Т-клеточные эпитопы, которые включают положения 70 и 91, как описано в Таблице 1. Эпитопы, показанные в Таблице 1, определены в отношении минимального 9-мерного пептида с сильным якорным остатком для МНС класса II в первом положении.

Таблица 1

Т-клеточные эпитопы, включающие положение 70	Т-клеточные эпитопы, включающие положение 91
LRQFLKMNS (SEQ ID NO:48)	ILLNCTGQV (SEQ ID NO:52)
FLKMNSTGD (SEQ ID NO:49)	LLNCTGQVK (SEQ ID NO:53)
LKMNSTGDF (SEQ ID NO:50)	
MNSTGDFDL (SEQ ID NO:51)	

Согласно изобретению один способ снижения иммуногенности продуцируемого бактериями IL-7 состоит во введении одной или более чем одной из приведенных ниже мутаций: Leu63Ala, Leu63Val, Leu63Pro, Leu63Thr, Lys68Asp, Met69Asp, Lys68Glu, Met69Glu, Ile88Thr, Ile88Ala, Ile88Val и Val96Gly. Другие мутации могут быть введены в положениях 63, 68, 69, 88 и/или 94. Некоторые мутации особенно полезны в комбинации, такие как пары Lys68Asp в сочетании с Met69Asp и/или Ile88Thr в сочетании с Val96Gly.

Когда эти мутации вводят в IL-7 или в слитый белок, содержащий IL-7, полученный в результате мутантный белок обычно обладает достаточной биологической активностью IL-7, чтобы быть полезным в качестве терапевтического белка. Действительно, биологическая активность IL-7-составляющей составляет по меньшей мере 10%, 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% по сравнению с биологической активностью IL-7 дикого типа. Активность IL-7 по изобретению можно тестировать в анализе *in vitro* или *in vivo*. В Примере 9 показан анализ по тестированию биологической активности вариантов IL-7 по изобретению.

Кроме того, эти мутации, как правило, дают возможность правильной укладки IL-7-составляющей, так что можно выделить чистый белок, в основном свободный от высокомолекулярных агрегатов и неправильно связанных дисульфидными мостиками форм. Однако укладку и биологическую активность, которая является результатом любой конкретной комбинации, следует тестировать, например, как проиллюстрировано в Примерах, чтобы удостовериться, что получена желаемая активность.

Согласно изобретению альтернативной стратегией по снижению иммуногенности продуцируемого бактериями IL-7 является изменение Asn70 и Asn91 на аспарагиновую кислоту. Не желая связываться теорией, мутация Asn70 и Asn91 на аспарагиновую кислоту может быть полезна по следующим причинам.

Иммуногенность вводимого экзогенно терапевтического белка отчасти опосредована через презентацию Т-клеточных эпитопов, имеющих происхождение от этого терапевтического белка. Считают, что такая презентация появляется посредством следующего механизма. Терапевтический белок захватывается антигенпрезентирующей клеткой (АРС), такой как дендритная клетка, макрофаг или В-клетка, путем эндоцитоза. Этот белок транспортируется в группу везикул, называемых эндосомами, включая ранние, средние и поздние эндосомы. В этих везикулах окружающие условия прогрессивно становятся более жесткими и менее благоприятными для внеклеточных, связанных дисульфидными мостиками белков, которые могут стабильно укладываться при нейтральном рН. Протеазы, называемые катепсинами, разрушают интернализированные белки на малые пептиды. Затем доля этих белковых фрагментов становится связанной белками МНС класса II, которые транспортируют эти фрагменты к клеточной поверхности в виде комплексов МНС класса II/пептид. Такие комплексы распознаются Т-клеточными рецепторами на CD4+ Т-клетках.

В случае пептидов, имеющих происхождение от чужеродных белков, презентация комплекса МНС класса II/пептид может стимулировать иммунный ответ. Однако в случае пептидов, имеющих происхождение от собственных белков, существует множество механизмов, посредством которых Т-клетки, распознающие комплексы МНС класса II/пептид, удаляются, либо предотвращается активация ими иммунного ответа.

Взяв два предшествующих параграфа за основу, важно рассмотреть, как будет происходить процессинг N-гликозилированного белка в эндосоме. Такой белок может разрушаться до пептидов, содержащих N-сшитый олигосахарид, которые могут связываться с молекулами МНС класса II. В соответствии с идеей изобретения эндосома также содержит эндогликозидазу, которая иногда удаляет олигосахарид из аспарагина и при этом превращает аспарагин в аспарагиновую кислоту. Таким образом, последовательности собственного белка, которые содержат сшитые с аспарагином олигосахариды, могут быть презентированы МНС класса II в виде пептидов, содержащих аспарагин, сшитый с олигосахаридом, или в виде соответствующих пептидов, содержащих аспарагиновую кислоту вместо аспарагина.

Как часть изобретения, также известно, что данная стратегия по снижению иммуногенности белков млекопитающих, которые экспрессируются в бактериях, может использоваться в общем виде. Конкретно замена аспарагиновой кислоты на аспарагин в сайте N-сшитого гликозилирования обычно обладает эффектом

снижения иммуногенности белка млекопитающих, который экспрессируется в прокариоте.

Изобретение содержит дополнительные мутации, которые снижают иммуногенность IL-7 и IL-7-содержащих слитых белков при их экспрессии либо в бактериальных клетках, либо в клетках млекопитающих. Эти мутации включают те, которые перечислены ниже в Таблице 2. IL-7 или IL-7-содержащий слитый белок может содержать одну или более чем одну из этих мутаций. Например, в одном воплощении IL-7 модифицируют таким образом, чтобы он включал одну или более чем одну из L24D, M54A, F57K, A60S, R61E, M147K и T149S, причем K150, E151 и H152 делетированы. В другом воплощении IL-7 модифицируют таким образом, чтобы он включал одну или более чем одну из D76N, L77D, T87Q, I88T, V96G, L119S, M147K и T149S, причем K150, E151 и H152 делетированы. В следующем воплощении IL-7 можно модифицировать таким образом, чтобы он включал одну или более чем одну из L24D, I30T, F39P, M54A, F57K, A60S, R61E, M68D, N69D, L77D, T87Q, I88T, V96G, L119S, L128A, M147K и T149S, причем K150, E151 и H152 делетированы.

В другом воплощении молекула IL-7 или IL-7-содержащий слитый белок может включать мутации одного или более чем одного остатка из 39, 57, 77 и/или 128 IL-7. Например, IL-7 в одном воплощении включает мутацию в остатке 39. В другом воплощении IL-7 включает мутацию в остатке 57. В следующем воплощении IL-7 включает мутации в обоих остатках 39 и 57. Еще в одном другом воплощении IL-7 включает мутации в остатках 39, 57 и 128, тогда как в другом воплощении IL-7 включает мутации в остатках 39, 57 и 77. Еще в одном другом воплощении IL-7 включает мутации в остатках 39, 57, 77 и 128. В следующем воплощении остаток фенилаланина в положении 39 заменен остатком пролина (F39P). В другом воплощении остаток фенилаланина в положении 57 заменен остатком аспарагина (F57N). В другом воплощении остаток лейцина в положении 77 заменен аспарагиновой кислотой (L77D). Еще в одном другом воплощении остаток лейцина в положении 128 заменен серином (L128S).

Таблица 2

Исходное положение в зрелом человеческом IL-7	Замена
Gln22 Leu24 Ile30 Phe39	Asp Asp Thr Pro
Met54 Phe57 Arg58 Ala60	Ala Lys, Asn Asp Ser
Arg61 Leu63 Lys68 Met69	Glu Ala, Val, Pro Asp Asp
Leu77 Ile88 Val96 Leu104	Asp Thr Gly Ser, Val
Leu128 Met147 Thr149 Lys150	Ala, Val, Pro, Ser Lys Ser Stop

Проверка сниженной иммуногенности белков по изобретению

Чтобы проверить, что результатом мутации по изобретению действительно была сниженная иммуногенность, можно использовать стандартные экспериментальные тесты, которые хорошо известны в данной области техники. Например, можно использовать анализ Т-клеточной стимуляции (например Jones *et al.*, (2004), *J. Interferon Cytokine Res.*, 24: 560). В таком анализе мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) получают и культивируют в соответствии со стандартными условиями. После возможной предварительной стимуляции пептид, соответствующий потенциальному эпитопу МНС класса II, добавляют в культуру PBMC; PBMC дополнительно инкубируют, и позже добавляют меченый тритием тимидин. Пептид может представлять собой

минимальный 9-мер, либо может иметь примерно 10-15 аминокислотных остатков или более. Затем после дальнейшей инкубации клеток измеряют включение меченого тритием тимидина в ДНК с помощью стандартных методик.

5 Считают, что анализ Т-клеточной стимуляции действует посредством нижеописанных механизмов. Во-первых, если пептид используют в качестве стимулятора, этот пептид должен, прежде всего, связываться с молекулой МНС 10 класса II, присутствующей на клетке среди РВМС. Во-вторых, комплекс МНС класса II/пептид должен продуктивно взаимодействовать с Т-клеточным рецептором на CD4+ Т-клетке. Если тестируемый пептид неспособен к достаточно прочному связыванию с молекулой МНС класса II, в результате сигнала не будет. 15 Если пептид способен к связыванию с молекулой МНС класса II, и имеются Т-клетки, экспрессирующие правильно перестроенный Т-клеточный рецептор, способный к распознаванию конкретного комплекса МНС класса II/пептид, в результате будет сигнал. Однако если такие Т-клетки удалены за счет процесса 20 негативной селекции, в результате сигнала не будет. Эти механизмы считают релевантными для иммуногенности белковой последовательности, как заключают на основании стимуляции или отсутствия стимуляции данным пептидом.

25 Если распознающие Т-клетки присутствуют в очень низких количествах в популяции РВМС по стохастическим причинам, связанным с неспособностью соответствующего Т-клеточного рецептора иметь место или с пролиферацией других, нерелевантных Т-клеток с последующим гомеостазом Т-клеточной 30 популяции, сигнал может также отсутствовать, даже если сигнал ожидается. Таким образом, могут встречаться ложноотрицательные результаты. На основании этих соображений важно использовать большое число различных источников РВМС и тестировать эти образцы независимо. Как правило, полезно также тестировать РВМС из этнически разнообразной группы людей и определять аллели МНС 35 класса II, присутствующие в каждой популяции РВМС.

40 Стандартный Т-клеточный анализ обладает тем недостатком, что сигнал включения трития часто является только в два раза более высоким, чем фоновое включение. Белки и пептиды по изобретению можно также тестировать в модифицированном Т-клеточном анализе, в котором, например, очищенные CD4+ 45 Т-клетки и очищенные дендритные клетки культивируют совместно в присутствии тестируемого пептида с последующей экспозицией с меченым тритием тимидином, а затем анализируют на включение меченого тритием тимидина. Этот второй анализ обладает тем преимуществом, что включение меченого тритием тимидина 50

в нерелевантные клетки, такие как CD8+ T-cells, по существу элиминировано, и фон, таким образом, снижен.

5 Третий анализ включает тестирование белка-кандидата со сниженной иммуногенностью у животного, такого как примат. Такой анализ будет, как правило, включать тестирование полноразмерного белка IL-7 или IL-7-содержащего слитого
10 белка, в котором IL-7-составляющая сконструирована путем тестирования индивидуальных пептидов-компонентов на потенциальную иммуногенность в анализе на клеточной основе, таком как описан выше. Как только такой IL-7-содержащий белок-кандидат сконструирован и экспрессирован, этот белок тестируют на иммуногенность путем инъекции животному.

15 Инъекцию белка, содержащего модифицированный IL-7, обычно проводят таким же способом, как при ожидаемом пути доставки во время терапевтического применения у людей. Например, можно применять внутривенную, подкожную, внутримышечную, внутривенную инъекцию или внутривенную инфузию. Если
20 применяют более чем одно введение, эти введения можно проводить различными путями.

В целях тестирования на иммуногенность может быть полезным совместно
25 вводить адъювант для усиления сигнала и минимизации числа животных, которых необходимо использовать. Если используют адъювант, возможно применение адъюванта, в котором отсутствует белковый компонент, такой как некодирующая ДНК с неметилированными динуклеотидами CpG, бактериальный липид А, N-формилметионин или другие бактериальные небелковые компоненты. Не
30 связываясь теорией можно сказать, что основная причина избегания адъювантов, содержащих белок, состоит в том, что другие белки могут давать T-клеточные эпитопы, которые будут в конечном счете вносить вклад в ответ антител против белка-кандидата.
35

После одного или более чем одного введения IL-7-содержащего белка-кандидата присутствие антител против IL-7 тестируют в соответствии со
40 стандартными методиками, такими как метод ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). Обнаружено, что молекулы, содержащие измененный IL-7 по изобретению, индуцируют образование антител реже и в меньшей степени, чем соответствующие молекулы, содержащие нормальный человеческий IL-7.
45

Многие из белков по изобретению изменяют поверхностные остатки IL-7. Предполагают, что белки по изобретению, хотя являются менее иммуногенными, чем соответствующие белки, содержащие человеческий IL-7, могут все же иногда
50 вызывать образование антител. Поскольку B-клеточные эпитопы белков по

изобретению, как правило, отличаются от таковых у не модифицированных IL-7, антитела к белкам по изобретению, как правило, не будут перекрестно реагировать с эндогенным IL-7, и образование антител к белкам по изобретению не будет иметь отдаленных последствий для здоровья пациента.

Слитые белки Fc-IL-7

Ключевой аспект изобретения состоит в том, что IL-7, модифицированный согласно изобретению, можно сливать с белком-носителем с образованием слитого белка. В одном воплощении белок-носитель расположен с N-конца слитого белка, а IL-7 расположен с C-конца. В другом воплощении IL-7 расположен с N-конца слитого белка, а белок-носитель расположен с C-конца.

Белок-носитель может представлять собой любой полипептид, ковалентно слитый с белком IL-7. В одном воплощении белок-носитель представляет собой альбумин, например человеческий сывороточный альбумин. Альбуминовая составляющая может быть слита с C-концом или с N-концом IL-7-составляющей. В другом воплощении белок-носитель представляет собой иммуноглобулиновую (Ig) составляющую, такую как тяжелая цепь Ig. Цепь Ig может иметь происхождение от IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. Согласно изобретению Ig-составляющая может представлять собой интактное антитело и может направлять слитый белок IL-7 к специфичным сайтам-мишеням в организме. Слитые белки, в которых используют сенсibilизацию мишени антителами, известны специалистам в данной области техники.

В одном воплощении Ig-составляющая содержит участок Fc. Как используют здесь, "участок Fc" охватывает домены, имеющие происхождение от константной области иммуноглобулина, такого как человеческий иммуноглобулин, включая фрагмент, аналог, вариант, мутант или производное константной области. Подходящие иммуноглобулины включают IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и другие классы. Константную область иммуноглобулина определяют как встречающийся в природе или полученный синтетически полипептид, гомологичный C-концевой области иммуноглобулина, и она может включать шарнирную область, CH2 домен, CH3 домен или CH4 домен, по отдельности или в любой комбинации. В настоящем изобретении участок Fc типично включает по меньшей мере CH2 домен. Например, Fc участок может включать шарнирную область-CH2-CH3. Альтернативно Fc участок может включать все целиком или часть из шарнирной области, CH2 домена и/или CH3 домена. Способы получения слитых белков Fc-IL-7 раскрыты в предварительной заявке на патент США № 60/533406.

Константная область иммуноглобулина ответственна за многие важные функции антитела, включая связывание Fc рецептора (FcR) и фиксацию комплемента. Существует пять основных классов константной области тяжелой цепи, классифицируемых как IgA, IgG, IgD, IgE и IgM. Например, IgG делят на четыре γ подкласса: $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ и $\gamma 4$, также известных как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, соответственно.

Молекулы IgG взаимодействуют с множеством классов клеточных рецепторов, включая три класса рецепторов Fc γ (Fc γ R), специфичных для IgG класса антитела, а именно Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Сообщалось, что важные последовательности для связывания IgG с рецепторами Fc γ R расположены в CH2 и CH3 доменах. На период полужизни антитела в сыворотке влияет способность этого антитела к связыванию с рецептором Fc (FcR). Подобным образом, на период полужизни в сыворотке белков, слитых с иммуноглобулином, также влияет способность к связыванию с такими рецепторами (Gillies *et al.*, (1999) Cancer Res. 59: 2159-66). По сравнению с таковыми IgG1, CH2 и CH3 домены IgG2 и IgG4 обладают биохимически не обнаружимым или сниженным аффинитетом связывания с рецепторами Fc. Сообщалось, что белки, слитые с иммуноглобулином, содержащие CH2 и CH3 домены IgG2 или IgG4, обладают более длительными периодами полужизни в сыворотке по сравнению с соответствующими слитыми белками, содержащими CH2 и CH3 домены IgG1 (патент США № 5541087; Lo *et al.*, (1998) Protein Engineering, 11: 495-500). Соответственно, в некоторых воплощениях изобретения CH2 и CH3 домены имеют происхождение от изоформа антител со сниженным аффинитетом связывания рецептора и эффекторными функциями, такого как, например, IgG2 или IgG4.

Шарнирная область в норме расположена к С-концу от CH1 домена константной области тяжелой цепи. В изоформах IgG дисульфидные связи типично встречаются внутри этой шарнирной области, что дает возможность образования конечной тетрамерной молекулы. В данной области доминируют пролины, серины и треонины. При включении в настоящее изобретение шарнирная область типично является по меньшей мере гомологичной области встречающегося в природе иммуноглобулина, которая включает цистеиновые остатки для образования дисульфидных связей, сшивающих две составляющие Fc. Репрезентативные последовательности шарнирных областей для иммуноглобулинов человека и мыши известны в данной области техники, и их можно найти в Borrebaeck, C. A. K., ed., (1992) Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Co.

Пригодные шарнирные области для настоящего изобретения могут иметь происхождение от IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и других классов иммуноглобулинов.

5 Шарнирная область IgG1 имеет три цистеина, два из которых вовлечены в дисульфидные связи между двумя тяжелыми цепями иммуноглобулина. Те же цистеины дают возможность образования эффективного и прочного дисульфидного связывания участка Fc. Таким образом, шарнирная область по
10 настоящему изобретению в одном воплощении имеет происхождение от IgG1, такого как человеческий IgG1. Когда используют шарнирную область IgG1, первый цистеин может быть мутирован до другой аминокислоты, такой как серин.

15 Шарнирная область изотипа IgG2 имеет четыре дисульфидные связи, которые склонны стимулировать олигомеризацию и, возможно, неправильное дисульфидное связывание в процессе секреции в рекомбинантных системах. Пригодная шарнирная область может иметь происхождение от шарнирной области
20 IgG2. В одном воплощении первые два цистеина шарнирной области IgG2 мутированы до другой аминокислоты.

25 Известно, что шарнирная область IgG4 образует межцепочечные дисульфидные связи неэффективно. Однако пригодная шарнирная область для настоящего изобретения может иметь происхождение от шарнирной области IgG4 и может содержать мутацию, которая способствует правильному образованию дисульфидных связей между составляющими, образованными из тяжелых цепей
30 (Angal *et al.*, (1993) *Mol. Immunol.*, 30: 105-8).

35 В соответствии с настоящим изобретением участок Fc может содержать CH2 и/или CH3 и/или CH4 домены и шарнирную область, которая имеет происхождение от различных изотипов антител, то есть гибридный участок Fc. Например, в одном воплощении участок Fc содержит CH2 и/или CH3 домены, имеющие происхождение от IgG2 или IgG4, и мутантную шарнирную область, имеющую происхождение от IgG1. Альтернативно в гибридном участке Fc
40 используют мутантную шарнирную область от другого подкласса IgG. Например, можно использовать мутантную форму шарнирной области IgG4, которая дает возможность эффективного дисульфидного связывания между двумя тяжелыми цепями. Мутантная шарнирная область может также иметь происхождение от шарнирной области IgG2, в которой каждый из первых двух цистеинов мутирован
45 до другой аминокислоты. Такие гибридные участки Fc способствуют высокому уровню экспрессии и улучшают правильную сборку слитых белков Fc-IL-7. Сборка таких гибридных участков Fc известна в данной области техники и описана в
50 опубликованной патентной заявке США № 2003-0044423.

В некоторых воплощениях участок Fc содержит модификации аминокислот, которые, как правило, продлевают период полужизни Fc-слитого белка в сыворотке. Такие модификации аминокислот включают мутации, существенно снижающие или элиминирующие активность связывания Fc-рецептора или фиксации комплемента. Например, может быть удален сайт гликозилирования внутри участка Fc тяжелой цепи иммуноглобулина. В IgG1 сайт гликозилирования представляет собой Asn297 внутри аминокислотной последовательности Gln-Tyr-Asn-Ser (SEQ ID NO:54). В других изотипах иммуноглобулинов сайт гликозилирования соответствует Asn297 IgG1. Например, в IgG2 и IgG4 сайт гликозилирования представляет собой аспарагин внутри аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO:55). Соответственно, мутация Asn297 IgG1 удаляет сайт гликозилирования в участке Fc, имеющем происхождение от IgG1. В одном воплощении Asn297 заменен Gln. В других воплощениях тирозин внутри аминокислотной последовательности Gln-Tyr-Asn-Ser (SEQ ID NO:54) дополнительно мутирован, чтобы элиминировать потенциальный не собственный Т-клеточный эпитоп, образованный в результате мутации аспарагина. Например, аминокислотная последовательность Gln-Tyr-Asn-Ser (SEQ ID NO:54) внутри тяжелой цепи IgG1 может быть заменена аминокислотной последовательностью Gln-Ala-Gln-Ser (SEQ ID NO:56).

Подобным образом в IgG2 или IgG4 мутация аспарагина внутри аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO:55) удаляет сайт гликозилирования в участке Fc, имеющем происхождение от тяжелой цепи IgG2 или IgG4. В одном воплощении аспарагин заменен глутамином. В другом воплощении фенилаланин внутри аминокислотной последовательности Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO:55) дополнительно мутирован, чтобы элиминировать потенциальный не собственный Т-клеточный эпитоп, образованный в результате мутации аспарагина. Например, аминокислотная последовательность Gln-Phe-Asn-Ser (SEQ ID NO:55) внутри тяжелой цепи IgG2 или IgG4 может быть заменена аминокислотной последовательностью Gln-Ala-Gln-Ser (SEQ ID NO:56). Другие мутации, которые полезны для уменьшения связывания Fc-рецептора, раскрыты в патентной заявке США № 09/256156.

Также сделано наблюдение, что изменение аминокислот около соединения участка Fc и участка не-Fc может резко повысить период полужизни Fc-слитого белка в сыворотке (опубликованная патентная заявка США № 2002-0147311). Соответственно, область соединения Fc-IL-7 или IL-7-Fc-слитого белка по настоящему изобретению может содержать изменения, которые, относительно

5 встречающихся в природе последовательностей тяжелой цепи иммуноглобулина и IL-7, расположены в пределах примерно 10 аминокислот от точки соединения. Эти аминокислотные замены могут вызвать увеличение гидрофобности путем, например, замены C-концевого лизина участка Fc гидрофобной аминокислотой, такой как аланин или лейцин (см., например, SEQ ID NO:34). Еще в одном другом воплощении изобретения C-концевой лизин и предшествующий глицин участка Fc делетированы (см., например, SEQ ID NO:35).

10 В других воплощениях участок Fc содержит изменения аминокислот сегмента Leu-Ser-Leu-Ser около C-конца участка Fc тяжелой цепи иммуноглобулина. Аминокислотные замены сегмента Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO:57) элиминируют потенциальные соединительные Т-клеточные эпитопы. В одном воплощении аминокислотная последовательность Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO:57) около C-конца участка Fc заменена аминокислотной последовательностью Ala-Thr-Ala-Thr (SEQ ID NO:58). В других воплощениях аминокислоты внутри сегмента Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO:57) заменены другими аминокислотами, такими как глицин или пролин. Подробные способы образования аминокислотных замен сегмента Leu-Ser-Leu-Ser (SEQ ID NO:57) около C-конца IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или молекул других классов иммуноглобулинов, а также другие примерные модификации для изменения соединительных Т-клеточных эпитопов описаны в опубликованной патентной заявке США № 2003-0166877.

30 В одном воплощении между белком-носителем и белком IL-7 встроен спейсерный или линкерный пептид. Этот спейсерный или линкерный пептид может быть незаряженным, либо неполярным, либо гидрофобным. Длина спейсерного или линкерного пептида находится между 1 и примерно 100 аминокислотами, либо между 1 и примерно 50 аминокислотами, либо между 1 и примерно 25 аминокислотами, либо между 1 и примерно 15 аминокислотами. В одном воплощении спейсер содержит последовательность $(G_4S)_n$, где n равно менее 10. В другом воплощении линкерная последовательность представляет собой GGGGSGGGG (SEQ ID NO:17). Еще в одном другом воплощении спейсер содержит мотив, который распознается N-сшитым сайтом гликозилирования. В другом воплощении изобретения белок-носитель и IL-7-слитый белок соединены через спейсерный или линкерный пептид. В альтернативном воплощении изобретения белок-носитель и IL-7-слитый белок разделены синтетическим спейсером, например PNA спейсером. Этот спейсер может быть незаряженным, либо неполярным, либо гидрофобным.

Продуцирование слитых белков IL-7

Слитые белки, содержащие IL-7, модифицированный согласно положениям изобретения, можно синтезировать с помощью не ограничивающих способов, описанных здесь. Анализы, полезные для тестирования фармакокинетической активности слитых белков, содержащих IL-7, модифицированный согласно изобретению, в животных моделях *in vivo*, также описаны здесь.

Слитые белки IL-7 по изобретению можно продуцировать, используя рекомбинантные экспрессионные векторы, известные в данной области техники. Термин "экспрессионный вектор" относится к реплицируемой конструкции ДНК, используемой для экспрессии ДНК, которая кодирует желаемый слитый белок IL-7 и которая включает единицу транскрипции, содержащую упорядоченную структуру (1) генетического элемента(ов), обладающего регуляторной ролью в генной экспрессии, например: промоторов, операторов или энхансеров, - оперативно сцепленного с (2) последовательностью ДНК, кодирующей желаемый слитый белок IL-7, которая транскрибируется на мРНК и транслируется в белок, и (3) соответствующие последовательности инициации и терминации транскрипции и трансляции. Выбор промотора и других регуляторных элементов обычно варьирует в соответствии с предназначенной клеткой-хозяином.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок IL-7, трансфицируют в клетку-хозяина, используя методики рекомбинантных ДНК. В контексте настоящего изобретения чужеродная ДНК включает последовательность, кодирующую белки по изобретению. Пригодные клетки-хозяева включают прокариотические, дрожжевые или высшие эукариотические клетки. В одном воплощении хозяин представляет собой прокариотический организм.

Рекомбинантные слитые белки IL-7 могут экспрессироваться в дрожжевых хозяевах, как, например, из видов *Saccharomyces*, таких как *S. cerevisiae*. Можно также использовать дрожжи других родов, таких как *Pichia* или *Kluyveromyces*. Дрожжевые векторы будут, как правило, содержать репликатор из дрожжевой плазмиды или автономно реплицирующуюся последовательность (ARS), промотор, ДНК, кодирующую слитый белок IL-7, последовательности для полиаденилирования и терминации транскрипции и ген селекции. Подходящие промоторные последовательности в дрожжевых векторах включают промоторы металлотioneина, 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, гексокиназы, пируватдекарбоксилазы, фосфофруктокиназы, глюкозо-4-

фосфатизомеразы, 3-фосфоглицератмутазы, пируваткиназы, триозофосфатизомеразы, фосфоглюкозоизомеразы и глюкокиназы.

5 Для экспрессии рекомбинантного белка можно использовать различные системы клеточных культур млекопитающих или насекомых. Бакуловирусные системы для продуцирования белков в клетках насекомых хорошо известны в данной области техники. Примеры подходящих клеточных линий-хозяев 10 млекопитающих включают клетки NS/O, L клетки, клеточные линии C127, 3T3, яичника китайского хомячка (CHO), HeLa и ВНК. Дополнительные подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают клетки CV-1 (ATCC CCL70) и клетки COS-7, где и те и другие имеют происхождение из почек обезьяны. Другая 15 подходящая линия клеток почек обезьяны, CV-1/EBNA, была образована путем трансфекции клеточной линии CV-1 геном, кодирующим ядерный антиген-1 вируса Эпштейна-Барра (EBNA-1), и вектором, содержащим регуляторные последовательности CMV (McMahan *et al.*, (1991), EMBO J., 10: 2821). Ген EBNA-1 20 дает возможность эпизомной репликации экспрессионных векторов, таких как HAV-EO или pDC406, которые содержат ориджин репликации EBV.

25 Экспрессионные векторы млекопитающих могут содержать нетранскрибируемые элементы, такие как ориджин репликации, подходящий промотор и энхансер, сцепленные с геном, который нужно экспрессировать, и другие 5'- или 3'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности и 5'- или 3'-нетранслируемые последовательности, такие как необходимые сайты 30 связывания рибосомы, сайт полиаденилирования, донорные и акцепторные сайты сплайсинга и последовательности терминации транскрипции. Общепринято используемые промоторы и энхансеры имеют происхождение от вируса полиомы, аденовируса 2, вируса обезьян 40 (SV40) и цитомегаловируса человека. 35 Последовательности ДНК, имеющие происхождение от вирусного генома SV40, например ориджин, ранний и поздний промотор, энхансер, сайты сплайсинга и полиаденилирования SV40, можно использовать для обеспечения других генетических элементов, требующихся для экспрессии гетерологичной 40 последовательности ДНК.

45 Когда желательна секреция слитого белка IL-7 из клетки-хозяина, экспрессионный вектор может содержать ДНК, кодирующую сигнальный или лидерный пептид. В настоящем изобретении можно использовать нативную сигнальную последовательность IL-7 или альтернативно можно добавить гетерологичную сигнальную последовательность, такую как сигнальная 50 последовательность из интерлейкина-4.

В настоящем изобретении также предложен способ получения рекомбинантных белков по настоящему изобретению, при котором культивируют клетку-хозяина, трансформированную экспрессионным вектором, содержащим последовательность ДНК, которая кодирует слитый белок IL-7, в условиях, которые стимулируют экспрессию. Затем желаемый белок очищают из культуральной среды или клеточных экстрактов. Например, надосадочные жидкости из экспрессионных систем, которые секретируют рекомбинантный белок в культуральную среду, можно сначала концентрировать, используя имеющийся в продаже фильтр для концентрирования белка, например, устройство для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. После стадии концентрирования концентрат можно нанести на подходящий матрикс для очистки, как известно в данной области техники.

“Изолированный” или “очищенный” слитый белок IL-7 или его биологически активный участок является по существу свободным от клеточного вещества или других загрязняющих белков из клеточного или тканевого источника, из которого выделяют слитый белок IL-7, или по существу свободным от химических предшественников или других химических веществ, когда его синтезируют химическим путем. Выражение “по существу свободный от клеточного вещества” включает препараты слитого белка IL-7, в которых белок отделен от клеточных компонентов клеток, из которых его выделяют или продуцируют рекомбинантным путем. В одном воплощении выражение “по существу свободный от клеточного вещества” включает препараты слитого белка IL-7, содержащие менее чем примерно 30% (от сухой массы) белка, не представляющего собой слитый белок IL-7 (также называемого здесь “загрязняющий белок”), менее чем примерно 20% белка, не представляющего собой слитый белок IL-7, менее чем примерно 10% белка, не представляющего собой слитый белок IL-7, или менее чем примерно 5% белка, не представляющего собой слитый белок IL-7. Когда слитый белок IL-7 или его биологически активный участок очищают из рекомбинантного источника, он является в одном воплощении по существу свободным от культуральной среды, то есть культуральная среда составляет менее чем примерно 20%, менее чем примерно 10% или менее чем примерно 5% объема белкового препарата.

Термин “по существу чистый слитый белок Ig-IL-7” или “по существу чистый слитый белок IL-7” относится к препарату, в котором IL-7-содержащий слитый белок составляет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% белков в препарате.

Способы лечения с использованием белков IL-7

Белки IL-7, включая слитые белки, по изобретению полезны при лечении иммунодефицитов и при ускорении естественного восстановления иммунной системы, которое происходит, например, после заболеваний или терапий, которые по природе являются иммуносупрессивными. Например, белки IL-7 можно применять для лечения вирусных инфекций, иммунных расстройств и для усиления роста (включая пролиферацию) специфичных типов клеток. Кроме того, белки IL-7 можно применять при лечении раков, таких как рак мочевого пузыря, рак легкого, рак головного мозга, рак молочной железы, рак кожи и рак простаты. Например, полезно лечение пациентов, которые перенесли один или более чем один цикл химиотерапии, белками IL-7, как описано выше, чтобы помочь пополнению их иммунных клеток. Альтернативно также полезно вводить белки IL-7, описанные выше, пациентам с ВИЧ, пожилым людям, пациентам после трансплантации или другим пациентам с подавленной функцией иммунной системы.

Введение

Как IL-7, так и слитые белки IL-7 по изобретению можно включать в фармацевтическую композицию, пригодную для введения. Такие композиции типично содержат IL-7 или слитый белок IL-7 и фармацевтически приемлемый носитель. Как используют здесь, в выражение “фармацевтически приемлемый носитель” следует включать любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и тому подобное, совместимые с фармацевтическим введением. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники.

Препарат фармацевтической композиции по изобретению готовят таким образом, чтобы он был совместимым с предназначенным путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например ингаляцию), чрескожное (местное), чресслизистое и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, фиксированные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или

метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регуляции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. рН можно регулировать кислотами или основаниями, такими как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы многократных доз, изготовленные из стекла или пластика.

Лекарства, которые содержат белки IL-7 по изобретению, могут иметь концентрацию от 0,01 до 100% (масс/масс), хотя это количество варьирует в соответствии с лекарственной формой этих лекарств.

Вводимая доза зависит от массы тела пациентов, от серьезности заболевания и от мнения врача. Однако, как правило, целесообразно вводить между примерно 0,01 и примерно 10 мг/кг массы тела в сутки, от примерно 0,02 до примерно 2 мг/кг/сутки в случае инъекции или примерно 0,5 мг/кг/сутки. Эту дозу можно вводить один раз или несколько раз в сутки в соответствии с серьезностью заболевания и мнением врача.

Композиции по изобретению полезны при совместном введении с одним или более чем одним другим терапевтическим агентом, например какой-либо известной молекулой, полезной для пополнения кровяных клеток. Например, эта молекула может представлять собой эритропоэтин, про который известно, что он применяется для пополнения красных кровяных клеток, G-CSF, который применяют для пополнения нейтрофилов, или GM-CSF, который применяют для пополнения гранулоцитов и макрофагов.

Далее аспекты изобретения проиллюстрированы приведенными ниже примерами.

Примеры

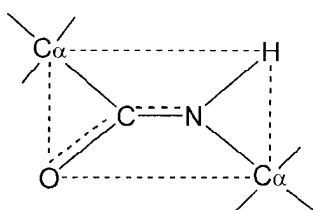
Пример 1: Идентификация Т-клеточных эпитопов компьютерными методами

Согласно изобретению эпитопы IL-7 можно модифицировать, используя способы введения мутаций в белки для моделирования их взаимодействия с иммунной системой. Эти способы подобны тем, которые описаны в опубликованной патентной заявке США № 2003-0166877. Согласно изобретению известные в данной области техники способы, которые можно адаптировать в соответствии с изобретением, включают те, которые описаны в уровне техники (WO 92/10755 и WO 96/40792 (Novo Nordisk)), EP 0519 596 (Merck & Co.), EP 0699

755 (Centro de Immunologia Moelcular), WO 98/52976 и WO 98/59244 (Biovation Ltd.), или подобные способы.

5 Предпочтительные мутантные белки, однако, могут быть получены, если идентификацию указанных эпитопов осуществляют приведенным ниже способом, который подробно описан здесь и применен к IL-7. Существует ряд факторов, которые играют важную роль в определении общей структуры белка, полипептида
10 или иммуноглобулина. Во-первых, пептидная связь, то есть та связь, которая соединяет аминокислоты в цепи вместе, представляет собой ковалентную связь. Эта связь является плоской по структуре, главным образом замещенный амид. "Амид" представляет собой любую из групп органических соединений, содержащих группировку -CONH-.

15 Плоская пептидная связь, соединяющая $C\alpha$ соседних аминокислот, может быть представлена, как изображено ниже:



30 Поскольку атомы $O=C$ и $C-N$ лежат в относительно жесткой плоскости, свободное вращение вокруг их осей не происходит. Следовательно, плоскость, схематически изображенную пунктирной линией, иногда называют "амидной" или "пептидной плоскостью", в которой расположены атомы кислорода (O), углерода (C), азота (N) и водорода (H) пептидного каркаса. В противоположных углах амидной плоскости расположены атомы $C\alpha$. Поскольку по существу отсутствует вращение вокруг атомов $O=C$ и $C-N$ в пептидной или амидной плоскости, полипептидная цепь, таким образом, содержит серию плоских пептидных связей,
35 соединяющих атомы $C\alpha$.

40 Вторым фактором, который играет важную роль при определении общей структуры или конформации полипептида или белка, является угол вращения каждой амидной плоскости вокруг общей $C\alpha$ -связи. Термины "угол вращения" и "угол поворота" здесь далее рассматривают как эквивалентные термины. Принимая, что атомы O, C, N и H остаются в амидной плоскости (что обычно является обоснованным предположением, хотя могут быть некоторые небольшие отклонения от плоскости этих атомов для некоторых конформаций), эти углы
45
50

5 вращения определяют конформацию N и R полипептидного каркаса, то есть
структуры, как она существует между соседними остатками. Эти два угла известны
как ϕ и ψ . Расположение углов ϕ_i , ψ_i , где нижний индекс i представляет конкретный
10 остаток полипептидной цепи, таким образом, эффективно определяет вторичную
структуру полипептида. Соглашения, использованные при определении углов ϕ , ψ ,
то есть относительных точек, в которых амидные плоскости образуют угол ноль
15 градусов, и определение того, какой угол является ϕ и какой угол является ψ для
данного полипептида, даны в литературе (см., например, Ramachandran *et al.*,
(1968), Adv. Prot. Chem., 23: 283-437, на страницах 285-94).

15 Этот способ можно применять к любому белку, и он отчасти основан на
открытии, что у людей углубление связывания первичного якорного положения
кармана 1 молекулы МНС класса II имеет хорошо определенную специфичность
для конкретных боковых цепей аминокислот. Специфичность этого кармана
20 определяется природой аминокислоты в положении 86 бета-цепи молекулы МНС
класса II. Этот сайт расположен на дне кармана 1 и определяет размер боковой
цепи, которая может быть помещена в этот карман. Marshall, J. Immunol., (1994),
152: 4946-4956. Если данный остаток представляет собой глицин, тогда все
25 гидрофобные алифатические и ароматические аминокислоты (гидрофобными
алифатическими аминокислотами являются валин, лейцин, изолейцин, метионин, и
ароматическими аминокислотами являются фенилаланин, тирозин и триптофан)
30 могут быть помещены в этот карман, причем предпочтение существует для
ароматических боковых цепей. Если этот остаток кармана представляет собой
валин, тогда боковая цепь этой аминокислоты выступает в карман и ограничивает
размер возможных помещающихся в него боковых цепей пептида таким образом,
35 что могут быть помещены только гидрофобные алифатические боковые цепи.
Следовательно, в последовательности аминокислотных остатков, где обнаружена
аминокислота с гидрофобной алифатической или ароматической боковой цепью,
40 существует потенциал для МНС класса II рестрицированного Т-клеточного эпитопа.
Однако если боковая цепь является гидрофобной алифатической, вероятность ее
соответствия Т-клеточному эпитопу примерно в два раза больше, чем
ароматической боковой цепи (принимая примерно равномерное распределение
45 типов кармана 1 по всей популяции в целом).

Примерный компьютерный метод профилирует вероятность содержания Т-
клеточных эпитопов в областях пептида IL-7, как описано ниже: (1) Сканируют
50 первичную последовательность пептидного сегмента предопределенной длины, и

идентифицируют все присутствующие гидрофобные алифатические и ароматические боковые цепи. (2) Гидрофобным алифатическим боковым цепям назначают более высокую оценку, чем для ароматических боковых цепей; предпочтительно примерно в два раза более высокую оценку, назначенную ароматическим боковым цепям, например оценку 2 для гидрофобной алифатической боковой цепи и оценку 1 для ароматической боковой цепи. (3) Оценки, определенные как присутствующие, суммируют для каждого перекрывающегося сегмента аминокислотных остатков (окна) predeterminedной одинаковой длины внутри пептида, и суммарную оценку для конкретного сегмента (окна) приписывают единственному аминокислотному остатку в промежуточном положении сегмента (окна), предпочтительно остатку примерно в средней точке сегмента-образца (окна). Эту процедуру повторяют для каждого выбранного перекрывающегося сегмента аминокислотных остатков (окна). Таким образом, каждому аминокислотному остатку пептида приписывают оценку, которая относится к вероятности присутствия Т-клеточного эпитопа в данном конкретном сегменте (окне). (4) Оценки, вычисленные и приписанные, как описано на стадии 3 выше, можно нанести на график против координат аминокислот всей оцениваемой последовательности аминокислотных остатков. (5) Все участки последовательности, которые имеют балл predeterminedной величины, например балл 1, считают вероятно содержащими Т-клеточный эпитоп, и они могут быть модифицированы, если желательно.

В данном конкретном аспекте настоящего изобретения предложен общий способ, с помощью которого можно описать Т-клеточные эпитопы II-7. Модификации пептида в этих областях обладают потенциалом модификации характеристик связывания МНС класса II.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения, Т-клеточные эпитопы могут быть предсказаны с большей точностью путем использования более усложненного компьютерного метода, который учитывает взаимодействия пептидов с моделями аллелей МНС класса II.

Компьютерное прогнозирование Т-клеточных эпитопов, присутствующих внутри пептида, согласно данному конкретному аспекту предполагает конструирование моделей по меньшей мере 42 аллелей МНС класса II на основании структур всех известных молекул МНС класса II и способ использования этих моделей при компьютерной идентификации Т-клеточных эпитопов; конструирование библиотек пептидных каркасов для каждой модели, чтобы обеспечить возможность известной вариабельности в относительном положении

альфа-атомов углерода ($C\alpha$) пептидного каркаса; конструирование библиотек конформаций боковой цепи аминокислот для каждого каркаса, стыкуемого с каждой моделью для каждой из 20 альтернативных аминокислот в положениях, критических для взаимодействия между пептидом и молекулой МНС класса II; и использование этих библиотек каркасов и конформаций боковых цепей в сочетании с функцией назначения баллов для отбора оптимального каркаса и конформации боковой цепи для конкретного пептида, стыкуемого с конкретной молекулой МНС класса II; и выведение балла связывания на основании этого взаимодействия.

Модели молекул МНС класса II можно вывести посредством моделирования гомологии из ряда подобных структур, найденных в базе данных Brookhaven Protein Data Bank ("PDB"). Эти модели могут быть получены путем использования программного обеспечения полуавтоматического моделирования гомологии (Modeller *et al.*, (1993), J. Mol. Biol., 234:779-815), которое включает функцию симулированного отжига в сочетании с силовым полем для минимизации энергии CHARMM (имеющееся в продаже от Molecular Simulations Inc., San Diego, Ca.). Можно также использовать альтернативные способы моделирования.

Известны другие компьютерные методы, в которых используют библиотеки выведенных экспериментальным путем данных по связыванию каждой альтернативной аминокислоты в каждом положении в связывающем углублении для небольшой группы молекул МНС класса II (Marshall *et al.*, (1995), Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1(3): 157-162), а также известны и другие компьютерные методы, в которых используют подобные экспериментальные данные связывания с целью определения характеристик связывания конкретных типов связующих карманов в пределах углубления, опять же, использующие небольшую группу молекул МНС класса II, а затем 'смешивающие и сопоставляющие' типы карманов из данной библиотеки карманов, чтобы искусственно создать дополнительные 'виртуальные' молекулы МНС класса II (Sturniolo *et al.*, (1999), Nat. Biotech., 17(6): 555-561). Оба метода страдают основным недостатком, который связан со сложностью анализов и необходимостью синтеза больших количеств пептидных вариантов, причем только небольшое число молекул МНС класса II можно сканировать экспериментальным путем. Следовательно, первым методом можно сделать прогнозы лишь для небольшого числа молекул МНС класса II. При втором методе также делают предположение, что карман, высланный подобными аминокислотами в одной молекуле, будет обладать такими же характеристиками связывания, когда находится в контексте другого аллеля класса II, и этот метод

страдает дополнительными недостатками в связи с тем, что 'виртуально' могут
быть созданы только те молекулы МНС класса II, которые содержат карманы,
имеющиеся в пределах библиотеки карманов. Используя подход к моделированию,
описанный здесь, можно вывести структуру любого числа и типа молекул МНС
5 класса II, следовательно, аллели могут быть специфично выбраны как
репрезентативные для популяции в целом. Кроме того, число сканируемых
10 молекул МНС класса II можно увеличить путем создания дополнительных моделей,
вместо получения дополнительных данных посредством сложных экспериментов.

Использование библиотеки каркасов дает возможность варьирования в
положениях атомов $C\alpha$ различных сканируемых пептидов при стыковке с
15 различными конкретными молекулами МНС класса II. Это, опять же, противоречит
альтернативным компьютерным методам, описанным выше, которые основаны на
использовании упрощенных пептидных каркасов для сканирования связывания
20 аминокислот в конкретных карманах. Эти упрощенные каркасы, вероятно, не
являются репрезентативными для конформаций каркасов, обнаруженных в
'реальных' пептидах, что приводит к неточностям в предсказании пептидного
связывания. Настоящая библиотека каркасов создана путем наложения каркасов
25 всех пептидов, связываемых молекулами МНС класса II, обнаруженных в Protein
Data Bank, и с учетом среднего квадратичного отклонения (RMS) между атомами
 $C\alpha$ каждой из одиннадцати аминокислот, расположенных внутри связывающего
углубления. Хотя эта библиотека может быть получена из небольшого числа
30 пригодных доступных мышинных и человеческих структур (в настоящее время 13),
чтобы дать возможность даже большей варибельности, величину RMS для
каждого $C''-\alpha$ положения увеличивают на 50%. Затем определяют среднее $C\alpha$
35 положение каждой аминокислоты, и рисуют сферу вокруг данной точки, радиус
которого равен среднему квадратичному отклонению, RMS отклонению, в данном
положении плюс 50%. Эта сфера представляет все допустимые $C\alpha$ -положения.

Опираясь на $C\alpha$ с наименьшим RMS отклонением (то есть аминокислоты в
40 кармане 1, как упомянуто выше, эквивалентной положению 2 из 11 остатков в
связывающем углублении), в сфере строят трехмерную решетку, а затем каждую
вершину внутри этой решетки используют в качестве возможной локализации $C\alpha$
45 этой аминокислоты. Следующую амидную плоскость, соответствующую пептидной
связи со следующей аминокислотой, переносят на каждый из этих атомов $C\alpha$, и
углы ϕ и ψ ступенчато поворачивают через серию интервалов с целью расположить
50 следующий $C\alpha$. Если этот следующий $C\alpha$ попадает в пределы 'сферы допустимых

положений' для данного $C\alpha$, тогда ориентацию этого дипептида принимают, в то время как, если он попадает вне круга, тогда этот дипептид отвергают. Затем этот процесс повторяют для каждого из следующих положений $C\alpha$, так что пептид наращивают от 'затравки' $C\alpha$ кармана 1 до тех пор, пока все девять следующих атомов $C\alpha$ не будут расположены на основании всех возможных перестановок предшествующих атомов $C\alpha$. Затем этот процесс повторяют еще раз для отдельного предшествующего $C\alpha$ кармана 1 для создания библиотеки положений $C\alpha$ в каркасе, расположенных внутри связывающего углубления.

Число полученных каркасов зависит от нескольких факторов: Размера 'сферы допустимых положений'; точности решетки 'первичной сферы' при положении кармана 1; точности ступенчатого вращения углов ϕ и ψ , используемого при расположении последующих атомов $C\alpha$. Используя данный процесс, можно создать большую библиотеку каркасов. Чем больше эта библиотека каркасов, тем больше вероятность того, что будет найдено оптимальное совпадение для конкретного пептида в пределах связывающего углубления молекулы МНС класса II. Ввиду того, что не все каркасы будут подходящими для стыковки со всеми моделями молекул МНС класса II вследствие конфликта с аминокислотами связывающих доменов, для каждого аллеля создают подгруппу библиотеки, содержащую каркасы, которые могут быть приспособлены к данному аллелю. Использование библиотеки каркасов в сочетании с моделями молекул МНС класса II создают исчерпывающую базу данных, состоящую из допустимых конформаций боковой цепи для каждой аминокислоты в каждом положении связывающего углубления для каждой молекулы МНС класса II, стыкуемой с каждым допустимым каркасом. Эту группу данных создают, используя функцию простого пространственного перекрытия, где молекула МНС класса II стыкуются с каркасом, и боковую цепь аминокислоты прививают на каркас в желаемом положении. Каждую из вращаемых связей боковой цепи ступенчато поворачивают через серию интервалов, и полученные в результате положения атомов зависят от этой указанной связи. Отмечают взаимодействие атома с атомами боковых цепей связывающего углубления, и положения либо принимают, либо отвергают согласно следующему критерию: сумма суммарного перекрытия всех атомов, расположенных таким образом, не должна превышать predetermined величину. Таким образом, строгость конформационного поиска является функцией интервала, используемого при ступенчатом вращении связи, и predetermined предела суммарного перекрытия. Эта последняя величина может быть малой,

если известно, что конкретный карман является жестким; однако, эта жесткость может быть релаксирована, если известно, что положения боковых цепей кармана являются относительно гибкими. Таким образом, можно делать допущения для имитации вариаций гибкости внутри карманов связывающего углубления. Затем данный конформационный поиск повторяют для каждой аминокислоты в каждом положении каждого каркаса при стыковке с каждой из молекул МНС класса II для создания исчерпывающей базы данных конформаций боковых цепей.

Подходящее математическое выражение используют для оценки энергии связывания между моделями молекул МНС класса II в сочетании с конформациями пептидных лигандов, которые следует вывести эмпирическим путем с помощью сканирования обширной базы данных конформаций каркаса/боковых цепей, описанного выше. Таким образом, белок сканируют на потенциальные Т-клеточные эпитопы, подвергая каждый возможный пептид длины, варьирующей между 9 и 20 аминокислотами (хотя эту длину выдерживают постоянной для каждого сканирования), приведенным ниже компьютерным вычислениям: выбирают молекулу МНС класса II вместе с пептидным каркасом, допустимым для данной молекулы, и прививают на него боковые цепи, соответствующие желаемой пептидной последовательности. Данные о свойствах атома и межатомных расстояниях, относящиеся к конкретной боковой цепи в конкретном положении на каркасе, собирают для каждой допустимой конформации данной аминокислоты (полученной из базы данных, описанной выше). Это повторяют для каждой боковой цепи вдоль каркаса, и выводят баллы для пептида, используя функцию назначения баллов. Лучший балл для данного каркаса сохраняют, и процесс повторяют для каждого допустимого каркаса для выбранной модели. Баллы от всех допустимых каркасов сравнивают, и высший балл считают пептидным баллом для желаемого пептида в данной модели МНС класса II. Затем этот процесс повторяют для каждой модели с каждым возможным пептидом, производным от белка, подлежащего сканированию, и отображают баллы для пептидов против модели.

В контексте настоящего изобретения каждый лиганд, представленный на вычисление аффинитета связывания, представляет собой аминокислотный сегмент, выбранный из пептида или белка, как обсуждено выше. Таким образом, этот лиганд представляет собой выбранный отрезок из аминокислот длиной примерно от 9 до 20 аминокислот, имеющий происхождение из пептида, полипептида или белка известной последовательности. Термины "аминокислоты" и "остатки" здесь далее рассматривают как эквивалентные термины. Лиганд в форме последовательных аминокислот исследуемого пептида прививают на каркас из

библиотеки каркасов, располагают в связывающей щели молекулы МНС класса II из библиотеки моделей молекул МНС класса II посредством координат C^α-атомов пептидного каркаса, и допустимую конформацию для каждой боковой цепи выбирают из базы данных допустимых конформаций. Релевантные данные о свойствах атома и межатомных расстояниях также получают из этой базы данных и используют для вычисления балла связывания пептида. Лиганды с высоким аффинитетом связывания к связывающему карману МНС класса II отмечают как кандидаты для сайт-направленного мутагенеза. Аминокислотные замены получают в этом отмеченном лиганде (и, следовательно, в интересующем белке), который затем повторно тестируют, используя функцию назначения баллов с целью определения замен, который снижают аффинитет связывания ниже predetermined пороговой величины. Затем эти замены вводят в интересующий белок для удаления Т-клеточных эпитопов.

В связывание между пептидным лигандом и связывающим углублением молекулы МНС класса II вовлечены нековалентные взаимодействия, включающие, но не ограниченные ими: водородные связи, электростатические взаимодействия, гидрофобные (липофильные) взаимодействия и ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. Эти связи включены в функцию назначения пептидных баллов, как подробно описано ниже. Должно быть понятно, что водородная связь представляет собой нековалентную связь, которая может быть образована между полярными или заряженными группами и состоит из атома водорода, обобщенного двумя другими атомами. Атом водорода донора водорода имеет положительный заряд, где акцептор водорода имеет частичный отрицательный заряд. В целях взаимодействий пептид/белок донорами водородной связи могут быть либо атомы азота, к которым присоединен водород, либо атомы водорода, присоединенные к атомами кислорода или азота. Атомами-акцепторами водородной связи могут быть атомы кислорода, не присоединенные к атому водорода, атомы азота без присоединенных атомов водорода и одной или двух соединений, либо атомы серы только с одним соединением. Некоторые атомы, такие как атомы кислорода, присоединенные к атомам водорода, или иминные атомы азота (например C=NH) могут быть как акцепторами, так и донорами водорода. Энергии водородных связей находятся в диапазоне от 3 до 7 ккал/моль и являются значительно более сильными, чем Ван-дер-Ваальсовы связи, но более слабыми, чем ковалентные связи. Водородные связи также являются высоко направленными и являются самыми сильными, когда атом-донор, атом водорода и атом-акцептор являются коллинеарными. Электростатические связи образуются между противоположно

заряженными ионными парами, и сила этого взаимодействия обратно пропорциональна квадрату расстояния между атомами согласно закону Кулона. Оптимальное расстояние между ионными парами составляет примерно 2,8 Å. При взаимодействиях белок/пептид электростатические связи могут образоваться между аргинином, гистидином или лизином и аспаратом или глутаматом. Сила связи будет зависеть от рКа ионизирующей группы и диэлектрической константы среды, хотя эти связи являются примерно сходными по силе с водородными связями.

Липофильные взаимодействия представляют собой благоприятные гидрофобно-гидрофобные контакты, которые происходят между белком и пептидным лигандом. Обычно эти взаимодействия будут иметь место между боковыми цепями гидрофобных аминокислот пептида, углубленными внутрь карманов связывающего углубления, так что они недоступны воздействию растворителя. Доступность гидрофобных остатков растворителю в высокой степени неблагоприятна, поскольку окружающие молекулы растворителя принуждаются к водородному связыванию друг с другом с образованием каркасоподобных клатратных структур. Полученное в результате уменьшение энтропии является в высокой степени неблагоприятным. Липофильными атомами могут быть атомы серы, которые не являются ни полярными, ни водородными акцепторами, и атомы углерода, которые являются неполярными.

Ван-дер-Ваальсовы связи представляют собой неспецифические силы, обнаруженные между атомами, которые находятся на расстоянии 3-4Å друг от друга. Эти связи являются более слабыми и менее специфичными, чем водородные и электростатические связи. Распределение электронного заряда вокруг атома меняется со временем, и в любом случае это распределение заряда является несимметричным. Эта временная асимметрия в электронном заряде индуцирует подобную асимметрию в соседних атомах. Результирующие силы притяжения между атомами достигают максимума при Ван-дер-Ваальсовом расстоянии контакта, но очень быстро уменьшаются при расстоянии от 1Å до примерно 2Å. Напротив, когда атомы становятся разделенными расстоянием, меньшим, чем контактное, возрастающие отталкивающие силы становятся доминирующими, поскольку внешние электронные облака атомов перекрываются. Хотя силы притяжения являются относительно слабыми по сравнению с электростатическими и водородными связями (примерно 0,6 ккал/моль), силы отталкивания, в частности, могут быть очень важны при определении, может ли пептидный лиганд успешно связываться с белком.

В одном воплощении для оценки константы связывания используют функцию назначения баллов Бема (метод SCORE1) ((Böhm, H.J., (1994), J. Comput. Aided Mol. Des., 8(3): 243-256), которая включена здесь в полном объеме). В одном воплощении используют функцию назначения баллов для оценки связывающих аффинитетов (метод SCORE2) как индикатора лиганда, содержащего Т-клеточный эпитоп ((Böhm, H.J., (1998), J. Comput. Aided Mol. Des., 12(4): 309-323), которая включена здесь в полном объеме). Однако функции назначения баллов Бема, как описано в приведенных выше ссылках, используют для оценки связывающего аффинитета лиганда к белку, где уже известно, что этот лиганд успешно связывается с белком, и комплекс белок/лиганд уже имеет свою решенную структуру, где эта решенная структура присутствует в Protein Data Bank ("PDB"). Следовательно, функция назначения баллов разработана с использованием преимуществ известных данных положительного связывания. Чтобы дать возможность различения между положительными и отрицательными связывающими агентами, в это уравнение должна быть добавлена составляющая отталкивания. Кроме того, более удовлетворительная оценка энергии связывания достигнута с помощью компьютерного парного анализа липофильных взаимодействий, а не с использованием составляющей энергии, основанной на площади, вышеописанных функций Бема. Таким образом, в одном воплощении энергию связывания оценивают, используя модифицированную функцию назначения баллов Бема. В этой модифицированной функции назначения баллов Бема энергию связывания между белком и лигандом ($\Delta G_{\text{связи}}$) оценивают с учетом приведенных ниже параметров: Снижение энергии связывания вследствие общей потери трансляционной и вращательной энтропии лиганда (ΔG_0); вклады идеальных водородных связей ($\Delta G_{\text{вс}}$), где по меньшей мере один партнер является нейтральным; вклады невозмущенных ионных взаимодействий ($\Delta G_{\text{ионный}}$); липофильные взаимодействия между липофильными атомами лиганда и липофильными акцепторными атомами ($\Delta G_{\text{липо}}$); потеря энергии связывания вследствие замораживания внутренних степеней свободы в лиганде, то есть свобода вращения вокруг каждой связи C-C снижена ($\Delta G_{\text{вращения}}$); энергия взаимодействия между белком и лигандом (E_{vdw}). С учетом этих составляющих получают уравнение 1:

$$(\Delta G_{\text{связи}}) = (\Delta G_0) + (\Delta G_{\text{вс}} \times N_{\text{вс}}) + (\Delta G_{\text{ионный}} \times N_{\text{ионный}}) + (\Delta G_{\text{липо}} \times N_{\text{липо}}) + (\Delta G_{\text{вращения}} \times N_{\text{вращения}}) + (E_{\text{vdw}}).$$

где N представляет собой число условных взаимодействий для конкретной составляющей, и в одном воплощении ΔG_0 , $\Delta G_{\text{вс}}$, $\Delta G_{\text{ионный}}$, $\Delta G_{\text{липо}}$ и $\Delta G_{\text{вращения}}$

представляют собой константы, которым даны значения: 5,4, -4,7, -4,7, -0,17 и 1,4, соответственно.

Составляющую N_{bc} вычисляют согласно уравнению 2:

$$N_{bc} = \sum_{H\text{-связей}} f(\Delta R, \Delta\alpha) \times f(N_{\text{соседний}}) \times f_{\text{pcs}}$$

$f(\Delta R, \Delta\alpha)$ представляет собой штрафную функцию, которая учитывает большие отклонения водородных связей от идеальности, и ее вычисляют в соответствии с уравнением 3:

$$f(\Delta R, \Delta\alpha) = f1(\Delta R) \times f2(\Delta\alpha)$$

где: $f1(\Delta R) = 1$, если $\Delta R \leq \text{TOL}$

либо $= 1 - (\Delta R - \text{TOL})/0,4$, если $\Delta R \leq 0,4 + \text{TOL}$

либо $= 0$, если $\Delta R > 0,4 + \text{TOL}$

и: $f2(\Delta\alpha) = 1$, если $\Delta\alpha < 30^\circ$

либо $= 1 - (\Delta\alpha - 30)/50$, если $\Delta\alpha \leq 80^\circ$

либо $= 0$, если $\Delta\alpha > 80^\circ$

TOL представляет собой допустимое отклонение в длине водородной связи $= 0,25 \text{ \AA}$;

ΔR представляет собой отклонение длины водородной связи H-O/N от идеального значения $= 1,9 \text{ \AA}$;

$\Delta\alpha$ представляет собой отклонение угла водородной связи $\angle_{N/O-H...O/N}$ от его идеальной величины 180° .

$f(N_{\text{соседний}})$ обозначает различие между вогнутой и выпуклой частями поверхности белка и, следовательно, приписывает больший вес полярным взаимодействиям, обнаруженным в карманах, чем обнаруженным на поверхности белка. Эту функцию вычисляют согласно приведенному ниже уравнению 4:

$$f(N_{\text{соседний}}) = (N_{\text{соседний}}/N_{\text{соседний},0})^\alpha \quad \text{где } \alpha = 0,5.$$

$N_{\text{соседний}}$ представляет собой число не водородных атомов белка, которые находятся ближе чем 5 \AA , к любому данному атому белка.

$N_{\text{соседний},0}$ представляет собой константу $= 25$

f_{pcs} представляет собой функцию, которая дает площадь поверхности полярного контакта на водородную связь и, следовательно, дает различия между сильными и слабыми водородными связями, и ее значение определяют согласно следующему критерию:

$f_{\text{PCS}} = \beta$, когда $A_{\text{полярный}}/N_{\text{НВ}} < 10 \text{ \AA}^2$

или $f_{\text{PCS}} = 1$, когда $A_{\text{полярный}}/N_{\text{НВ}} > 10 \text{ \AA}^2$

$A_{\text{полярный}}$ представляет собой размер площади полярного контакта белок-лиганд

$N_{\text{НВ}}$ представляет собой число водородных связей

β представляет собой константу, значение которой = 1,2

Для введения модифицированной функции назначения баллов Бема вычисляют вклады ионных взаимодействий ($\Delta G_{\text{ионный}}$) способом, подобным способу для водородных связей, описанному выше, поскольку предполагают такую же геометрическую зависимость.

Составляющую $N_{\text{липо}}$ вычисляют согласно приведенному ниже уравнению 5:

$$N_{\text{липо}} = \sum_{\text{IL}} f(r_{\text{IL}})$$

$f(r_{\text{IL}})$ вычисляют для всех липофильных атомов лиганда, I, и всех липофильных атомов белка, L, согласно приведенному ниже критерию:

$$f(r_{\text{IL}}) = 1, \text{ когда } r_{\text{IL}} \leq R1 \quad f(r_{\text{IL}}) = (r_{\text{IL}} - R1)/(R2 - R1), \text{ когда } R2 < r_{\text{IL}} < R1$$

$$f(r_{\text{IL}}) = 0, \text{ когда } r_{\text{IL}} \geq R2$$

$$\text{где: } R1 = r_1^{\text{vdw}} + r_L^{\text{vdw}} + 0,5$$

$$\text{и } R2 = R1 + 3,0$$

и r_1^{vdw} представляет собой Ван-дер-Ваальсов радиус атома I

и r_L^{vdw} представляет собой Ван-дер-Ваальсов радиус атома L

Составляющую $N_{\text{вращение}}$ представляет собой число вращаемых связей боковых цепей аминокислот и за него взято число ациклических связей $sp^3 - sp^3$ и $sp^3 - sp^2$. Вращения концевых $-\text{CH}_3$ или $-\text{NH}_3$ не учитывают.

Конечную составляющую, E_{vdw} , вычисляют согласно приведенному ниже уравнению 6:

$$E_{\text{vdw}} = \varepsilon_1 \varepsilon_2 ((r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}})^{12}/r^{12} - (r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}})^6/r^6), \text{ где:}$$

ε_1 и ε_2 представляют собой константы, зависящие от свойств атома;

r_1^{vdw} и r_2^{vdw} представляют собой Ван-дер-Ваальсовы радиусы атомов; и

r представляет собой расстояние между парой атомов.

В отношении уравнения 6 в одном воплощении константы ε_1 и ε_2 представлены значениями для атомов: C: 0,245, N: 0,283, O: 0,316, S: 0,316, соответственно (то есть для атомов углерода, азота, кислорода и серы, соответственно). В отношении уравнений 5 и 6 Ван-дер-Ваальсовы радиусы представлены значениями для атомов C: 1,85, N: 1,75, O: 1,60, S: 2,00 \text{ \AA}.

5 Должно быть понятно, что все predetermined значения и константы, данные в приведенных выше уравнениях, определяют в пределах ограничений современного понимания взаимодействий белка и лиганда и с учетом типа вычислений, предпринятых здесь.

10 Как описано выше, функцию назначения баллов применяют к данным, извлеченным из базы данных конформаций боковых цепей, свойств атомов и межатомных расстояний. Для целей настоящего описания число молекул МНС класса II, включенных в эту базу данных, составляет 42 модели плюс четыре решенные структуры. На основании приведенных выше описаний должно быть очевидно, что модульная природа конструкций компьютерного метода по
15 настоящему изобретению означает, что новые модели могут быть легко добавлены и сканированы с библиотекой пептидных каркасов и функций конформационного поиска боковых цепей для создания дополнительных серий данных, которые могут быть обработаны функцией назначения пептидных баллов, как описано выше. Это
20 дает возможность легко увеличивать репертуар сканируемых молекул МНС класса II или замены структур и связанных с ними данных, если доступны данные для создания более точных моделей существующих аллелей.

25 Настоящий метод прогнозирования можно калибровать против серии данных, содержащей большое число пептидов, аффинитет которых к различным молекулам МНС класса II экспериментально определен ранее. Путем сравнения вычисленных и экспериментальных данных можно определить границу, про
30 которую известно, что выше нее все экспериментально определенные Т-клеточные эпитопы предсказаны правильно.

35 Должно быть понятно, что, хотя вышеописанная функция назначения баллов является относительно простой по сравнению с некоторыми усложненными методологиями, которые являются доступными, эти вычисления проводят крайне быстро. Должно быть также понятно, что цель состоит не в вычислении
40 действительной энергии связывания *как таковой* для каждого пептида, стыкуемого со связывающим углублением выбранного белка МНС класса II. Лежащая в основе цель состоит в получении сравнительных данных по энергии связывания как помощи в предсказании расположения Т-клеточных эпитопов на основании
45 первичной структуры (то есть аминокислотной последовательности) выбранного белка. Относительно высокая энергия связывания или энергия связывания выше выбранной пороговой величины позволяет предположить присутствие Т-клеточного эпитопа в лиганде. Затем этот лиганд можно подвергнуть по меньшей
50 мере одному раунду аминокислотных замен и повторно вычислить энергию

связывания. Благодаря быстрой природе вычислений эти манипуляции с пептидной последовательностью можно проводить интерактивно в пределах пользовательского интерфейса на экономически эффективном доступном компьютере. Следовательно, не требуется больших вложений в комплектующие к компьютерам.

Специалистам в данной области техники будет очевидно, что для тех же целей можно использовать другое доступное программное обеспечение. В частности, более усложненное программное обеспечение, которое способно к состыковке лигандов с сайтами связывания белка, можно использовать в сочетании с минимизацией энергии. Примерами такого программного обеспечения для состыковки является: DOCK (Kuntz *et al.*, (1982), J. Mol. Biol., 161:269-288), LUDI (Böhm, H.J., (1994), J. Comput Aided Mol. Des., 8:623-632) and FLEXX (Rarey *et al.*, (1995), ISMB, 3:300-308). Примеры молекулярного моделирования и манипуляционного программного обеспечения являются: AMBER (Tripos) и CHARMM (Molecular Simulations Inc.). Использование этих компьютерных методов будет сильно ограничивать производительность способа по настоящему изобретению вследствие удлинения времени обработки, требуемого для выполнения необходимых вычислений. Однако, вероятно, такие способы можно использовать в качестве 'вторичного скрининга' для получения более точных вычислений энергии связывания для пептидов, которые обнаружены как 'положительные связывающие агенты' способом по настоящему изобретению. Ограничение времени обработки для усложненных молекулярно-механических или молекулярно-динамических вычислений является таким, которое определяется либо дизайном программного обеспечения, которое делает эти вычисления, так и ограничениями современных технологий комплектующих к компьютерам. Можно принять, что в будущем при написании более эффективного кода и продолжающихся усовершенствованиях скорости компьютерных процессоров может стать возможным проведение таких вычислений в более удобных временных рамках. Дополнительную информацию по энергетическим функциям, применимым к макромолекулам, и рассмотрение различных взаимодействий, которые имеют место внутри уложенной белковой структуры, можно найти в: Brooks *et al.*, (1983), J. Comput. Chem., 4:187-217, и дополнительную информацию, касающуюся общих взаимодействий белок-лиганд, можно найти в: Dauber-Osguthorpe *et al.*, (1988), Proteins, 4(1): 31-47. Полезную базовую информацию можно также найти, например, в Fasman, G.D., ed., Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Plenum Press, New York, ISBN: 0-306 4313-9.

Пример 2: Анализ *In vitro* пептидов-производных IL-7 в качестве потенциальных эпитопов CD4+ Т-хелперных клеток с помощью нефракционированных культур PBMC

5 На основании предсказаний *in silico*, что последовательности, окружающие N-сшитые сайты гликозилирования белка IL-7 являются иммуногенными, пептиды, охватывающие эти районы, протяженностью, например, от Leu63 до Ser71
10 (LRQFLKMNS SEQ ID NO:48) или от Ile88 до Val96 (ILLNCTGQV SEQ ID NO:52) в зрелом человеческом белке IL-7, анализируют на их иммуногенность, которую измеряют на основании их способности индуцировать Т-клеточную пролиферацию *in vitro*. По существу PBMC, выделенные из крови человека, инкубируют с
15 индивидуальными перекрывающимися 15-мерными пептидами, и пролиферативные ответы измеряют по включению ³H-тимидина. В принципе, Т-клетки внутри смеси PBMC будут пролиферировать, только если они распознают
20 индивидуальные комплексы пептид-МНС на аутологичных АПК (антигенпрезентирующих клетках), и, таким образом, пролиферация является показателем иммуногенности пептида.

25 Например, 15-мерные пептиды, которые располагаются ступенчато по трем аминокислотам и имеют протяженность участка, например, от Met54 до Leu80 в человеческом IL-7, синтезируют (Pepscan Systems, Netherlands), ресуспендируют в ДМСО (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.) и используют в конечной
30 концентрации 5 мкМ в 0,5% ДМСО в культуральной среде.

PBMC выделяют из периферической крови от здоровых доноров с помощью градиентного центрифугирования Ficoll-Нугаце и хранят замороженными в жидком азоте. Кроме того, каждый образец PBMC HLA-типировать, используя набор
35 для SSP ПЦР-типирования (Bio-Synthesis, Lewisville, TX), на ДНК, выделенной с помощью набора QiaAmp Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA).

В типичном анализе пролиферации каждый из перекрывающихся 15-мерных пептидов анализируют в шести повторах культур PBMC, полученных от 40 обычных
40 доноров. Кратко, 2×10^5 PBMC, быстро оттаянных перед использованием, смешивают с 5 мкМ каждого пептида и инкубируют при 37°C в 5% CO₂ в течение 7 суток. В качестве положительного контроля образцы инкубируют с пептидом, полученным из столбнячного токсина, MQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:15), тогда как отрицательные контрольные образцы инкубируют с 0,5% ДМСО. Во время
45 последних 12 часов инкубации культуры метят импульсной меткой [метил-³H]тимидин (0,5 мКи/лунка) (NEN Life Science Products, Boston, MA), культуры
50

собирают на фильтровальных пленках, и включение тимидина измеряют в импульсах в минуту (CPM), используя сцинтилляционный счетчик для микропланшетов Wallac Microplate Beta Top Plate (Perkin Elmer, Boston, MA). Индекс стимуляции для каждого пептида вычисляют путем деления значения CPM данного пептида на значение CPM, полученное от отрицательных контролей.

Обнаружено, что индекс стимуляции положительного контрольного пептида значительно выше 1 (индекса стимуляции отрицательного контроля), и пептиды, содержащие внутреннюю последовательность LRQFLKMNS (SEQ ID NO:48), FLKMNSTGD (SEQ ID NO:49) или LKMNSTGDF (SEQ ID NO:50), такие как, например, пептиды ARKLRQFLKMNSTGD (SEQ ID NO:60), LRQFLKMNSTGDFDL (SEQ ID NO:61) или FLKMNSTGDFDLHLL (SEQ ID NO:62), имеют повышенный индекс стимуляции. Таким образом, пептидные последовательности, такие как LRQFLKMNS (SEQ ID NO:448) или LKMNSTGDF (SEQ ID NO:650) действительно представляют потенциальные Т-клеточные эпитопы.

Подобный анализ проводят с серией 15-мерных пептидов, охватывающих область, определенную внутренними пептидами ILLNCTGQV (SEQ ID NO:52) и LLNCTGQVK (SEQ ID NO:53), и обнаружено, что эти пептидные последовательности также представляют потенциальные Т-клеточные эпитопы.

Пример 3: Картирование эпитопов CD4⁺ Т-хелперных клеток с использованием дифференцированных человеческих дендритных клеток (DC) *in vitro*

Зрелые дендритные клетки (DC) являются эффективными антигенпрезентирующими клетками (АПК), которые эффективно презентуют антигенные пептиды или целые белки на Т-клетках. Изолированные DC, меченые импульсной меткой антигенных пептидов *in vitro*, используют для индукции первичных Т-клеточных ответов, которые измеряют в анализах пролиферации *in vitro*. Дифференцированные DC получают, например, с помощью приведенной ниже методики: сначала получают моноциты человека, давая возможность PBMC прикрепиться к пластмассовым колбам для тканевых культур, либо путем очистки CD14⁺ PBMC антителами с магнитной меткой (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Затем очищенные моноциты (от 0,5 до 1,5 x 10⁶ клеток/мл) культивируют в среде AIM V (GIBCO BRL, Grand Island, NY, U.S.A.), содержащей 1000 ед./мл GM-CSF (Endogen; Woburn, MA) и 500 ед./мл IL-4 (Endogen; Woburn, MA), в течение 3 суток. Затем эти незрелые DC метят импульсной меткой 5 мкг/мл экспериментальных или контрольных пептидов и инкубируют далее с комбинацией 1000 ед./мл TNF-α

(Endogen; Woburn, MA), 1000 ед./мл GM-CSF и 500 ед./мл IL-4 еще в течение 48 часов. Мониторинг зрелых DC проводят на основании высоких уровней поверхностной экспрессии CD80⁺, CD86⁺ и HLA-DR.

5 Эти зрелые меченые импульсным антигеном DC облучают 4200 Рад и используют в анализе пролиферации с очищенными аутологичными CD4⁺ Т-клетками. (CD4⁺ Т-клетки очищают антителами, мечеными магнитом (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), используя замороженные аликвоты PBMC от того же донора, который предоставил моноциты для дифференциации DC *in vitro*). В типичном анализе меченые импульсным антигеном DC (2×10^5 /мл) инкубируют вместе с CD4⁺ Т-клетками (2×10^6 клеток/мл) в круглодонных 96-луночных планшетах при 37°C в 10 5% CO₂ в течение 7 суток. [метил-³H]тимидин (NEN Life Science Products, Boston, MA) добавляют в течение последних 12 часов инкубации при 0,5 мКи/луночка, образцы собирают, лизируют на стеклянных фильтрах и измеряют включение ³H-тимидина в сцинтилляционном счетчике.

20 15-мерные пептиды, как описано в Примере 1, тестируют в данном анализе и сравнивают со сравнительными пептидами и другими контролями. Обнаружено, что данный анализ является более чувствительным, чем анализ, описанный в 25 Примере 1, поскольку дает возможность лучшего различения между способностью индивидуальных пептидов индуцировать Т-клеточную пролиферацию. Обнаружено, что пептиды IL-7, содержащие внутренние последовательности LRQFLKMNS (SEQ ID NO:48), FLKMNSTGD (SEQ ID NO:49), LKMNSTGDF (SEQ ID 30 NO:50), ILLNCTGQV (SEQ ID NO:52) или LLNCTGQVK (SEQ ID NO:53), действительно индуцируют значительную Т-клеточную пролиферацию и, следовательно, эти последовательности представляют потенциальные Т-клеточные эпитопы.

Пример 4: Анализ *in vitro* деиммунизирующих аминокислотных замен в IL-7

40 Аминокислотные замены в пептидных областях, описанных выше, которые считают придающими меньшую иммуногенность белку IL-7, тестируют в анализах *in vitro*, как описано в Примере 1 и в Примере 2. Например, ожидают, что вариант пептида IL-7, включающий последовательность LRQFLDDNS (SEQ ID NO:63), дает 45 значительно сниженный Т-клеточный пролиферативный ответ по сравнению с исходным пептидом дикого типа, включающим LRQFLKMNS (SEQ ID NO:48). Подобным образом ожидают, что вариант пептида IL-7, включающий последовательность TLLNCTGQG (SEQ ID NO:64), дает значительно сниженный Т-

клеточный пролиферативный ответ по сравнению с исходным пептидом дикого типа, включающим ILLNCTGQV (SEQ ID NO:52)

5 Синтезируют серию производных от IL-7 15-мерных пептидов, которые
включают варианты последовательностей IL-7 LRQFLDDNS (SEQ ID NO:63) или
TLLNCTGQG (SEQ ID NO:64), как описано в Примере 1. Кроме того, варианты
10 белков IL-7 или слитые белки, содержащие вариант IL-7, которые включают замены
по изобретению, продуцируют либо в прокариотической, либо в эукариотической
экспрессионной системе (Del-IL-7). Например, продуцируют вариант IL-7, который
15 включает аминокислотные замены K68D, M69D, I88T и V94G. (Кроме того, белки IL-
7, продуцируемые в прокариотах, включают стартовый метионин). Эти пептиды и
очищенные белки и их исходные двойники тестируют на их способность
индуцировать Т-клеточную пролиферацию в анализах с цельными культурами
PBMC, как описано в Примере 1, или путем импульсного мечения DC, как описано в
20 Примере 2. 25 мкг/мл белка используют для стимуляции PBMC или для
импульсного мечения DC.

Обнаружено, что в целом пептиды, производные от вариантов
25 последовательностей IL-7, обладают значительно сниженной способностью
индуцировать Т-клеточную пролиферацию по сравнению с соответствующими
пептидами, производными от человеческого белка IL-7 дикого типа. Таким образом,
эти варианты пептидных последовательностей являются значительно более
30 слабыми потенциальными Т-клеточными эпитопами. Подобным образом,
продуцируемый бактериями вариант белка IL-7 также обладает сниженной
способностью индуцировать Т-клеточную пролиферацию, чем IL-7 дикого типа, что
указывает на то, что эти мутантные области могут вносить значительный вклад в
35 иммуногенность продуцируемого прокариотами IL-7.

Пример 5: Анализ пептидов, производных от IL-7, как потенциальных В-клеточных эпитопов

40 Для продуцируемого бактериями негликозилированного человеческого
белка IL-7 последовательности, окружающие N-сшитые сайты гликозилирования
IL-7, могут распознаваться как "не собственные" иммунной системой человека и
вызывать ответ антител. По существу, чтобы оценить, представляют ли эти
45 последовательности линейные В-клеточные эпитопы, пептиды на протяжении этих
последовательностей используют для иммунизации кроликов и тестируют
реактивность полученных в результате антител против продуцируемого
50 бактериями нативного человеческого IL-7 и денатурированного человеческого IL-7.

В качестве дополнительного контроля используют нативный, продуцируемый эукариотами гликозилированный слитый белок huFc-IL-7.

5 Методы и материалы для выращивания поликлональных антител против специфичного пептидного антигена, например, в кроликах, и их последующей очистки в целом известны специалистам в данной области техники, и ссылки на них можно найти, например, в: Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Press.

10 Кратко, в одном примере пептид, содержащий внутреннюю последовательность FLKMNSTGD (SEQ ID NO:49), такой как LRQFLKMNSTGDFDL[C] (SEQ ID NO: 65) или [C]LRQFLKMNSTGDFDL (SEQ ID NO:66), связывают через добавленный концевой цистеин с тремя различными белками-носителями, гемоцианином блюдечка (KLH, EMD Biosciences, San Diego, CA), БСА (EMD Biosciences, San Diego, CA) и овальбумином (Pierce, Rockford, IL), используя связывающий агент, такой как SMCC (Pierce, Rockford, IL), и иммунизируют множество кроликов путем последовательных инъекций каждым из пептидных конъюгатов в присутствии адъюванта. Иммунный ответ усиливают дополнительными инъекциями одного из конъюгатов пептид-носитель через 25 месячные интервалы, и полученную в результате антисыворотку от каждого кролика очищают аффинной хроматографией на колонке Sulfo-Link (Pierce, Rockford, IL), в которой связан этот пептид, и антитело дополнительно концентрируют пропусканием через колонку с гидроксипатитом (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

30 Очищенные антитела тестируют против продуцируемого в бактериях нативного человеческого IL-7, денатурированного человеческого IL-7 и продуцируемого в эукариотах гликозилированного слитого белка huFc-IL-7 в анализе ELISA, следуя стандартным методикам. Кратко, планшеты для ELISA, покрытые препаратами очищенного белка, инкубируют с образцами тестируемого антитела, планшеты отмывают, инкубируют со вторым антителом, таким как конъюгированный с пероксидазой хрена IgG против кролика, снова отмывают и инкубируют с раствором хромогенного субстрата, чтобы определить концентрацию связанного антитела.

45 Подобным образом получают антитела к другим пептидам, включающим сайт гликозилирования ...MNSTG...(SEQ ID NO:50,51) (при Asn70) в человеческом IL-7, или к пептидам, включающим сайт гликозилирования ...LNCTG...(SEQ ID NO:52,53) (при Asn91). Используя этот подход, обнаружили, что, как правило, денатурированный продуцируемый в бактериях человеческий IL-7 хорошо

распознается антителами, и что гликозилированный слитый белок huFc-IL-7 не распознается. Пептиды, которые вызывают образование антител, реагирующих с продуцируемым в бактериях нативным человеческим белком IL-7, указывают на то, что линейный В-клеточный эпитоп в сайте гликозилирования распознается. Кроме того, обнаружили, что в анализе пролиферации на клеточной основе, как описано в Примере 9, антитела, выращенные против пептидов данного Примера, обладают эффектом ингибирования IL-7-стимулированной клеточной пролиферации. Это результат указывает на то, что эти антитела обладают нейтрализующей активностью.

Пример 6: Конструирование вариантов человеческого IL-7, в которых отсутствуют потенциальные Т-клеточные эпитопы

Конструируют нуклеиновые кислоты, которые кодируют различные варианты человеческого IL-7, либо пригодные для бактериальной экспрессии, либо пригодные для эукариотической экспрессии, например в виде слитого белка. Например, конструируют нуклеиновые кислоты, кодирующие вариант зрелого человеческого IL-7, содержащий замены K68D, M69D, I88T и V96G (Del-IL-7 SEQ ID NO:4), используя стандартные методы, известные специалистам в данной области техники. На фиг.11 показан пример такой последовательности ДНК, кодирующей вариант зрелого IL-7, Del-IL-7, с заменами кодонов аминокислотных остатков K68D, M69D, I88T и V96G (SEQ ID NO:11).

Для бактериальной экспрессии последовательность белка Del-IL-7, включающую стартовый метионин (bDel-IL-7 SEQ ID NO:5), обратно транслируют, используя смещение кодонов, пригодное для оптимальной экспрессии в *E. coli*. Полученную в результате нуклеиново-кислотную последовательность дополнительно адаптируют таким образом, чтобы она включала желаемые (или исключала нежелательные) признаки, такие как стоп-кодон или сайты рестрикции, и добавляют последовательности, которые облегчают клонирование в бактериальном экспрессионном векторе, например, в пригодном векторе из серии pET (EMD Biosciences, San Diego, CA). Нуклеиново-кислотную последовательность синтезируют путем синтеза целого гена (Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA) и встраивают в экспрессионный вектор. Пример последовательности ДНК, кодирующей bDel-IL-7, оптимизированный по кодонам для *E. coli* с заменами кодонов аминокислотных остатков K68D, M69D, I88T, V96G, показан на фиг.10 (SEQ ID NO:10).

Для эукариотической экспрессии в виде слитого белка huFc-Del-IL-7 нуклеиново-кислотную последовательность зрелого человеческого IL-7 модифицируют таким образом, чтобы она включала кодоны для желаемых аминокислотных мутаций по изобретению, как описано выше.. Последовательность дополнительно адаптируют таким образом, чтобы она включала фланкирующие последовательности с уникальными сайтами рестрикции для вставки в виде фрагмента XmaI/XhoI в рамке считывания в экспрессионный вектор pdCs-huFc, кодирующий шарнирную область, области CH2 и CH3 IgG1 (см. Lo *et al.*, (1998), Protein Engineering 11:495), и синтезируют путем синтеза целого гена (Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA). Затем синтетический фрагмент XmaI/XhoI Del-IL-7 клонируют в векторе pdCs-huFc с получением экспрессионной плазмиды, кодирующей huFc-Del-IL-7. Другие варианты IL-7 и Fc-IL-7 по изобретению могут быть получены подобными способами.

Конкретно, нуклеиновые кислоты, кодирующие человеческие деиммунизированные слитые белки Fc-IL-7 huFc γ 2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(PNS) и huFc γ 2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(PNDS), конструировали, как описано ниже. huFc γ 2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(PNS) представляет собой слитый белок человека Fc-IL-7, содержащий N-конец человеческого IL-7, генетически слитый с C-концом домена Fc человеческого IgG2 с шарнирной областью IgG1 через линкерную последовательность GGGGSGGGG. Участок Fc содержит мутации Phe296Ala и Asn297Gln. Участок IL-7 содержит мутации F39P, F57N и L128S. huFc γ 2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(PNDS) является таким же, как huFc γ 2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(PNS), но содержит дополнительную мутацию в IL-7-составляющей, L77D. Эта последовательность также содержит кодоны для мутации последовательности LSLS около C-конца участка Fc, которую заменяют на ATAT. Кроме того, эта нуклеиново-кислотная последовательность содержит кодоны для замены C-концевого лизина участка Fc остатком аланина.

Нуклеиновую кислоту последовательности, представленной на фиг.27, синтезировали *de novo* (Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA), и она кодирует линкерную последовательность GGGGSGGGG, за которой следует зрелый человеческий IL-7, содержащий аминокислотные замены F39P, F57N и L128S (IL-7(PNS)), и содержит фланкирующие сайты рестрикции XmaI и XhoI на 5'- и 3'-концах, соответственно. Этот очищенный фрагмент XmaI/XhoI лигировали в аналогично гидролизованной и очищенной векторный фрагмент серии pdCs-huFc, pdC10-huFc γ 2(h)(FN>AQ), с получением плазмиды, кодирующей huFc γ 2(h)(FN>AQ)-

(линкер2)-IL-7(PNS). Lo *et al.*, (1998), Protein Engineering 11:495. Кодирующую последовательность подтверждали путем секвенирования.

5 Дополнительное включение замены L77D в IL-7(PNS) осуществляли стандартными методами ПЦР мутагенеза, используя мутагенные праймеры M(s) (5'-TGACTTTGATGACCACCTGTTAAAAGTTTC-3' (SEQ ID NO: 69); мутированный кодон подчеркнут) и M(a) (5'-AACAGGTGGTCAATCAAAGTCACCAGTGC-3') (SEQ ID NO:70). Кратко, отдельные реакции ПЦР проводили на плазмидной матрице, содержащей (линкер2)-IL-7(PNS), одну с M(s) и правым праймером 5'-CTCGAGTCAGTGTCTTTAGTGCCCATC-3' (SEQ ID NO:71), другую с M(a) и левым праймером 5'-CCCGGGTGCTGGAGGTGGAGGATCAGGTG-3' (SEQ ID NO:72), фрагменты ПЦР очищали и объединяли в виде матрицы для второго раунда ПЦР, используя снова левый праймер 5'-CCCGGGTGCTGGAGGTGGAGGATCAGGTG-3' (SEQ ID NO:72) и правый праймер 5'-CTCGAGTCAGTGTCTTTAGTGCCCATC-3' (SEQ ID NO:71). Полученный в результате очищенный фрагмент вставляли в TA-клонировующий вектор pCR2.1 ((Invitrogen, Carlsbad, CA), и его последовательность подтверждали. Фрагмент XmaI/XhoI, кодирующий (линкер2)-IL-7(PNDS), вырезали и лигировали в аналогично гидролизованый и очищенный векторный фрагмент серии pdCs-huFc, pdC10-huFc₂(h)(FN>AQ), с получением плазмиды, кодирующей huFc₂(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(PNDS).

30 Подобным образом получают плазмиды, кодирующие варианты этих слитых белков, различающиеся по Fc-составляющей; например, плазмиду, кодирующую huFc₂(h)(линкер2)-IL-7(PNDS), получают путем лигирования фрагмента XmaI/XhoI, кодирующего (линкер2)-IL-7(PNDS), в аналогично гидролизованый и очищенный векторный фрагмент серии pdCs-huFc, pdC10-huFc₂(h).

Пример 7: Экспрессия и очистка вариантов IL-7

40 Для эукариотической экспрессии слитого белка huFc-Del-IL-7 используют электропорацию для введения ДНК, кодирующей этот слитый белок, в клеточную линию миеломы мыши NS/0. Для проведения электропорации клетки NS/0 выращивают в модифицированной по Дульбекко среде Игла с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной сыворотки теленка, 2 мМ глутамина и пенициллина/стрептомицина. Примерно 5x10⁶ клеток промывают один раз ФСБ и ресуспендируют в 0,5 мл ФСБ. Затем 10 мкг линейаризованной плазмидной ДНК для huFc-Del-IL-7 инкубируют с клетками в кювете для электропорации Gene Pulser (0,4 см промежуток между электродами, BioRad) на льду в течение 10 мин. Электропорацию проводят, используя прибор Gene Pulser (BioRad, Hercules, CA) с

установками на 0,25 В и 500 мкФ. Клеткам дают восстановиться в течение 10 мин на льду, после чего их ресуспендируют в ростовой среде и высевают на два 96-луночных планшета.

5 Стабильно трансфицированные клоны отбирают по их росту в присутствии 100 нМ метотрексата (MTX), который добавляют в ростовую среду через двое суток после трансфекции. Клетки подпитывают каждые 3 суток два-три или более раз, и 10 MTX-устойчивые клоны появляются в течение 2-3 недель. Надосадочные жидкости с клонов анализируют с помощью анти-Fc ELISA для идентификации клонов, которые продуцируют высокие количества слитого белка IL-7. Высокопродуктивные клоны выделяют и размножают в ростовой среде, содержащей 100 нМ MTX. 15 Типично используют ростовую среду без сыворотки, такую как среда H-SFM или CD (Life Technologies).

Стандартную очистку Fc-содержащих слитых белков проводят на основании 20 аффинитета белковой составляющей Fc для белка А. Кратко, клетки NS/0, экспрессирующие слитый белок, такой как huFc-Del-IL-7, выращивают в среде для тканевых культур, и надосадочную жидкость, содержащую экспрессируемый белок, собирают и загружают на предварительно уравновешенную колонку с сефарозой 25 Fast Flow Protein A. Затем колонку интенсивно промывают буфером (таким как 100 mM фосфат натрия, 150 mM NaCl при нейтральном pH). Связанный белок элюируют при низком pH (pH 2,5-3) в таком же буфере, как выше, и фракции немедленно нейтрализуют.

30 Бактериальную экспрессию и очистку bDel-IL-7 проводят по существу как описано Cosenza *et al.* для продуцируемого бактериями IL-7 (см. Cosenza *et al.*, (1997) JBC, 272:32995). По существу, bDel-IL-7 выделяют из тельца включения, 35 денатурируют и разворачивают. Кратко, культуры для бактериальной экспрессии, трансформированные экспрессионным вектором, кодирующим, например, bDel-IL-7, выращивают до средней логарифмической фазы и индуцируют экспрессию рекомбинантного белка. После индукции бактерии собирают и лизируют 40 ультразвуком, и тельца включения выделяют в буфере А (50 mM Трис HCl (7,5), 5 mM ЭДТА, 20% сахароза). После интенсивных отмывок тельца включения ресуспендируют в гуанидиновом денатурирующем буфере (50 mM Трис HCl (pH 8,0), 5 M гуанидин HCl, 5 mM ЭДТА), кратковременно озвучивают ультразвуком и 45 восстанавливают в 6 mM ДТТ. Затем денатурированный белок bDel-IL-7 дополнительно очищают денатурирующей вытеснительной ВЭЖХ по размеру. Затем белок повторно укладывают в буфере для укладки (50 mM глицин, 30 mM

NaOH, 0,4 М L-аргинин, 1 мМ ДТТ, рН 10), подвергают диализу в фосфатном буфере и дополнительно очищают вытеснительной ВЭЖХ по размеру.

5

Пример 8: Биохимический анализ вариантов IL-7

10

Воздействие введенных мутаций на целостность белков IL-7 оценивают с помощью рутинного восстанавливающего и не восстанавливающего электрофоретического анализа в ДСН-ПААГ и вытеснительной хроматографии по размеру.

15

Например, слитый белок huFc-Del-IL-7, экспрессируемый клетками NS/O, улавливают на гранулах сефарозы Protein A Sepharose (Repligen, Needham, MA) из тканевой культуральной среды, в которую он секретируется, и элюируют кипячением в буфере для белковых образцов с восстанавливающим агентом, таким как β-меркаптоэтанол, либо без него. Образец фракционируют с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, и полосы белка визуализируют окрашиванием Кумасси. Ожидают, что в слитом белке, содержащем мутации IL-7, которые существенно препятствуют правильной укладке, более вероятно выявляются продукты деградации с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ.

25

Очищенный huFc-Del-IL-7 также анализируют с помощью вытеснительной хроматографии по размеру (SEC), чтобы оценить степень агрегации слитого белка. Кратко, надосадочную жидкость клеточной культуры загружают на предварительно уравновешенную колонку с сефарозой Fast-Flow Protein A Sepharose, колонку интенсивно промывают физиологическим буфером (таким как 100 мМ фосфат натрия, 150 мМ NaCl при нейтральном рН), и связанный белок элюируют примерно при рН от 2,5 до 3 в таком же солевом буфере, как выше. Фракции немедленно нейтрализуют, пиковые фракции объединяют, и аликвоту фракционируют на аналитической колонке SEC.

30

35

Пример 9: Активность вариантов IL-7 *in vitro*

40

Чтобы определить, сохраняют ли варианты IL-7, содержащие мутации по изобретению, цитокиновую активность, проводят биологические анализы клеточной пролиферации *in vitro*. Человеческие РВМС (моноклеарные клетки периферической крови человека, Peripheral Blood Mononuclear Cells) активируют РНА-Р с получением клеток, которые являются реактивными к IL-7. Проллиферацию измеряют в стандартном анализе включения тимидина.

45

50

Например, определяют цитокиновую активность huFc-Del-IL-7 и bDel-IL-7. Кратко, РВМС сначала инкубируют в течение пяти суток с 10 мкг/мл РНА-Р, клетки

отмывают, а затем инкубируют в среде с huFc-Del-IL-7 или bDel-IL-7, приготовленными в виде серии разведений, суммарно в течение 48 часов. В течение последних 12 часов образцы метят импульсной меткой 0,3 мКи [метил-³H]тимидин (Dupont-NEN-027). Затем клетки интенсивно отмывают, собирают и лизируют на стеклянных фильтрах. ³H-тимидин, включенный в ДНК, измеряют в сцинтилляционном счетчике. В качестве стандарта анализируют белок дикого типа huIL-7, полученный от R&D Systems (Minneapolis, MN) или полученный из Национального Института биологических стандартов и контроля (NIBSC).

Значение ED50 клеточной пролиферации для huFc-Del-IL-7 или bDel-IL-7 получают в результате нанесения на график кривой доза-ответ в соответствии со стандартными методиками и определяют концентрацию белка, которая приводит к половинному максимальному ответу.

Пример 10: Индукция антител против человеческого IL-7 у обезьян IL-7 дикого типа и вариантами IL-7

Известно, что результатом введения обезьянам человеческого IL-7 дикого типа бактериального происхождения часто являются титры нейтрализующих антител против человеческого IL-7 (Storek *et al.*, (2003), Blood, 101:4209; Fry *et al.*, (2003), Blood, 101:2294). Следовательно, оценивают склонность продуцируемых прокариотами вариантов IL-7 и белков IL-7 дикого типа, а также продуцируемых эукариотами слитых белков, содержащих полипептиды IL-7 дикого типа или варианты, индуцировать нейтрализующие антитела у приматов, не представляющих собой человека. В типичном эксперименте макакам резус инъецируют 40 мкг/кг образцов белка подкожно один раз в сутки в течение четырех недель. Например, эти образцы белка представляют собой имеющийся в продаже продуцируемый прокариотами IL-7 (PeproTech, Rocky Hill, NJ), продуцируемый прокариотами вариант IL-7(K68D, M69D, I88T, V94G) и эквивалентные слитые белки Fc-IL-7, продуцируемые в экспрессионной системе млекопитающих. Через регулярные интервалы от животных получают сыворотку, и сывороточные концентрации антител против человеческого IL-7 измеряют с помощью ELISA, используя покрытые человеческим IL-7 96-луночные планшеты (Nunc, Naperville, IL). Типично несколько разведений каждого сывороточного образца добавляют в каждую лунку в трех повторах в течение двух часов, промывают 0,05% Твином (Твин 20) в ФСБ и блокируют 1% БСА/1% козьей сыворотка в ФСБ. В каждый образец добавляют конъюгированный с пероксидазой хрена IgG против макаки (1:60000 в буфере для образцов), инкубируют при 37°C в течение 2 ч, и планшет

5 промывают 8 раз 0,05% Твином в ФСБ. Затем образцы анализируют, используя раствор колориметрического субстрата OPD (о-фенилендиаминдигидрохлорида) путем измерения ОП при 490 нм с вычитанием фоновой ОП, считываемой при 650 нм.

10 Обнаружено, что продуцируемый прокариотами белок IL-7 дикого типа действительно вызывает высокие титры антител против IL-7. Напротив, титры антител к продуцируемому прокариотами варианту IL-7 оказываются значительно ниже, чем титры антител против IL-7. Также обнаружено, что различия в уровнях титров антител против IL-7, продуцируемых животными, которым были введены продуцируемые млекопитающими слитые белки Fc-IL-7 дикого типа и варианты (с мутациями вокруг N-сшитых сайтов гликозилирования) не являются настолько выраженными. Этот результат может указывать на то, что отсутствие гликозилирования в этих сайтах в белках, продуцируемых прокариотами, вносит вклад в иммуногенность этих белков.

Пример 11: Острая толерантность к Fc-IL-7 у иммунокомпетентных мышей

25 Слитый белок Fc-IL-7 huFcγ2(h)(N>Q)(линкер2)-huIL-7 получили способом, описанным в Примере 6, очищали, затем готовили препарат в 50 мМ фосфате, 150 мМ хлориде натрия pH 7,00, 0,05% (об/об) Твин 80. Концентрации белка разведенных растворов определяли, используя поглощение при 280 нм и теоретический коэффициент экстинкции 0,98 мг/ОП₂₈₀, основанный на известной последовательности белка. Для введения мышам аликвоту каждого образца отбирали из исходных флаконов и разводили 0,9% солевым раствором в пределах одного часа до введения.

35 Мышей C57B1/6 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) в возрасте 17 недель делили на группы по 2 мыши в каждой и вводили слитые белки Fc-IL-7 подкожно в течение 5 последовательных суток. Группам вводили либо дозировки 0,5, 5,0, 25 мг/кг, либо контроль-носитель ежесуточно. Все мыши перенесли эту обработку вплоть до суток 7, и в это время мышей умерщвляли.

45 Уровни Fc-IL-7 в плазме определяли путем получения образцов крови из ретроорбитального синуса через 6 часов после дозирования на сутки 0, 2, 4 и 7. Образцы крови собирали в пробирки, содержащие гепарин, для предотвращения свертывания. Клетки удаляли путем центрифугирования, и концентрацию интактного слитого белка Fc-IL-7 в плазме измеряли, используя стандартные методики ELISA. Уровни Fc-IL-7 в плазме в мкг/мкл для испытуемых мышей показаны на фиг.36. В плазме мышей выявлено зависимое от дозы повышение

концентрации Fc-IL-7 во всех исследованных временных точках, и она дополнительно возрастала после каждой дозы. Однако, как показано на фиг.37, величина прироста уменьшалась после каждого дозирования.

5 Функциональную активность Fc-IL-7 подтверждали путем измерения приростов в В-клетках и Т-клетках на сутки 7 после начала дозирования. Поскольку IL-7 усиливает продуцирование иммунных эффекторных клеток, таких как В-клетки
10 и Т-клетки, ожидают, что клеточность и масса селезенки увеличится. Мышей умерщвляли на сутки 7, и органы извлекали и взвешивали. На фиг.38 показаны средние массы органов на сутки 7. Как ожидали, масса селезенки увеличилась в 3-5 раз через 1 неделю после первоначальной дозы. Масса легких увеличилась в 2
15 раза после 2 самых высоких доз Fc-IL-7 за счет инфильтрации лимфоцитов. Никаких изменений массы не наблюдали в почках или печени.

 Ответ В-клеток (CD19+, CD4+, CD8+ и гранулоцитов (Gr-1+)) во всех группах наблюдали на сутки 7. На фиг. 39 показана частота клеток Gr-1+ в периферической
20 крови двух мышей в каждой группе. Как показывают эти данные, гранулоциты в целом были не реактивными в отношении Fc-IL-7. На фиг. 40 показана частота клеток CD19+ в периферической крови двух мышей в каждой группе. На фиг. 41
25 показана частота клеток CD4+ в периферической крови двух мышей в каждой группе, тогда как на фиг. 42 показана частота клеток CD8+ в периферической крови двух мышей в каждой группе. Числа приростов в В-клетках (фиг. 40) и Т-клетках
30 (фиг. 41 и 42) были максимальными для группы дозировки 5 мг/кг, причем каждая испытываемая мышь показала значительно увеличенные числа Т-клеток и В-клеток по сравнению с контрольной группой и группой дозировки 0,5 мг/кг. Однако числа Т-клеток либо снижались, либо повышались у мышей в группе дозировки 25 мг/кг.
35 Все измерения клеток приведены в клетках на мкл крови.

Пример 12. Оценка активности человеческого Fc-IL-7

 Биологическую активность слитого белка Fc-IL-7, протестированного в
40 Примере 11, измеряли на основании включения меченого тритием тимидина в стандартном анализе клеточной пролиферации, используя полученные с помощью ФГА бластные клетки мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC), согласно способу, описанному Yokota *et al.*, (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
45 83: 5894; и Stern *et al.*, (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6808-6812, где человеческий IL-7 использовали в качестве стандарта. Как показано на фиг.43, клеточная пролиферация, как измерено на основании включения меченого тритием
50 тимидина, для молекулы Fc-IL-7 была подобна таковой стандартного

человеческого IL-7 NIBSC (Всемирная Организация Здравоохранения), что указывает на то, что активность молекулы Fc-IL-7 подобна активности человеческого IL-7 дикого типа.

5

Эквиваленты

Изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от его сущности или основных признаков. Вышеописанные воплощения, таким образом, следует скорее рассматривать как во всех отношениях иллюстративные, чем ограничивающие изобретение, описанное здесь. Объем изобретения, таким образом, показан скорее прилагаемой формулой изобретения, чем приведенным выше описанием, и предполагается, что все изменения, которые происходят в пределах значения и диапазона эквивалентности формулы изобретения, входят в объем изобретения.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Gillies, Stephen D.
Way, Jeffrey

5

<120> Варианты IL-7 со сниженной иммуногенностью

<130> LEX-035

<150> US 60/634,470

10

<151> 2004-12-09

<160> 72

<170> PatentIn version 3.3

15

<210> 1

<211> 177

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

25

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
 20 25 30

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
 35 40 45

30

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
 50 55 60

35

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
65 70 75 80

40

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
 85 90 95

Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
 100 105 110

45

50

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
 115 120 125

5 Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
 130 135 140

10 Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
 145 150 155 160

Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
 165 170 175

15 His

20 <210> 2
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 2

25 Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile
 1 5 10 15

30 Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Ser Gly Arg
 20 25 30

35 Asp Gly Gly Ala Tyr Gln Asn Val Leu Met Val Asn Ile Asp Asp Leu
 35 40 45

Asp Asn Met Ile Asn Phe Asp Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60

40 Phe Phe Lys Lys His Ser Cys Asp Asp Asn Lys Glu Ala Ser Phe Leu
 65 70 75 80

45

50

Asn Arg Ala Ser Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser
 85 90 95

5 Asp Asp Phe Lys Leu His Leu Ser Thr Val Ser Gln Gly Thr Leu Thr
 100 105 110

10 Leu Leu Asn Cys Thr Ser Lys Gly Lys Gly Arg Lys Pro Pro Ser Leu
 115 120 125

Ser Glu Ala Gln Pro Thr Lys Asn Leu Glu Glu Asn Lys Ser Ser Arg
 130 135 140

15 Glu Gln Lys Lys Gln Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Ile Leu Leu Gln
 145 150 155 160

20 Lys Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Arg Gly Ile Lys Glu His
 165 170 175

<210> 3

<211> 176

25 <212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 3

30 Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile
 1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Phe Ser Gly Lys
 20 25 30

35 Asp Gly Gly Ala Tyr Gln Asn Val Leu Met Val Ser Ile Asp Asp Leu
 35 40 45

40 Asp Asn Met Ile Asn Phe Asp Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn
 50 55 60

45 Phe Phe Lys Lys His Ser Cys Asp Asp Asn Lys Glu Ala Ser Phe Leu
 65 70 75 80

50

Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Lys Gln Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser
 85 90 95

5 Asp Asp Phe Lys Leu His Leu Ser Thr Val Ser Gln Gly Thr Leu Thr
 100 105 110

10 Leu Leu Asn Cys Thr Ser Lys Gly Lys Gly Arg Lys Pro Pro Ser Leu
 115 120 125

Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Asn Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys
 130 135 140

15 Glu Gln Arg Lys Gln Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Ile Leu Leu Gln
 145 150 155 160

20 Lys Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Arg Gly Ile Thr Glu His
 165 170 175

<210> 4

<211> 152

25 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность деиммунизированного человеческого IL-7

30 <400> 4

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 1 5 10 15

35 Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 20 25 30

40 Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
 50 55 60

45

50

Gln Phe Leu Asp Asp Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
 65 70 75 80

5 Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Thr Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Gly
 85 90 95

10 Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
 100 105 110

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
 115 120 125

15 Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 130 135 140

20 Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150

<210> 5
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

25 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность продуцируемого бактериями
 деиммунизированного человеческого IL-7.

30 <400> 5

Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val
 1 5 10 15

35 Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
 20 25 30

40 Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
 35 40 45

45

50

Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
 50 55 60

5 Arg Gln Phe Leu Asp Asp Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
 65 70 75 80

10 Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Thr Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
 85 90 95

Gly Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
 100 105 110

15 Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
 115 120 125

20 Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn
 130 135 140

25 Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150

30 <210> 6
 <211> 456
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая зрелый IL-7 с
 заменами кодонов для F39P, F57N и L128S.

35 <400> 6
 gattgtgata ttgagggtaa ggatggcaaa cagtacgaga gtgttctaataat ggtgagcatc 60
 gaccagttat tggacagcat gaaggagatt gggagcaatt gcctgaataa cgaacccaac 120
 40 ttcttaaga gacacatctg cgatgccaat aaggaaggga tgttttaaa ccgtgctgcc 180
 cgcaagttga ggcaattcct taaaatgaac agcactggtg actttgatct ccacctgtta 240
 aaagttcag aaggcaccac aatcctgttg aactgcactg gccagggtgaa aggaaggaaa 300
 45 cctgctgccc tgggtgaagc tcaaccaaca aagagtttgg aggagaataa atctttaaag 360

50

gaacagaaaa aactgaatga cagctgttcc ctaaagagac tactgcaaga gataaaaaact 420

tgctggaata aaatcttgat gggcactaaa гаасас 456

5

<210> 7

<211> 152

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

10

<220>

<223> Аминокислотная последовательность зрелого IL-7 с кодонами для аминокислотных замен F39P, F57N и L128S

<400> 7

15

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15

20

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45

25

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60

30

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80

35

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110

40

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ser
115 120 125

45

50

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 130 135 140

5 Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150

<210> 8

<211> 456

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая зрелый IL-7 с кодонами для аминокислотных замен F39P, F57N, L77D и L128S.

<400> 8

gattgtgata ttgagggtaa ggatggcaaa cagtacgaga gtgttctaata ggtgagcatc 60

gaccagttat tggacagcat gaaggagatt gggagcaatt gcctgaataa cgaaccсаас 120

ttctttaaga gacacatctg cgatgccaat aaggaaggga tgttttaaa ccgtgctgcc 180

cgcaagtga ggcaattcct taaaatgaac agcactgggtg actttgatga ccacctgta 240

aaagttcag aaggcaccac aatcctgttg aactgcactg gccagggtgaa aggaaggaaa 300

cctgctgccc tgggtgaagc tcaaccaaca aagagtttgaggagaataa atctttaaag 360

gaacagaaaa aactgaatga cagctgtttc ctaaagagac tactgcaaga gataaaaact 420

tgctggaata aaatcttgat gggcactaaa gaacac 456

<210> 9

<211> 152

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность зрелого IL-7 с кодонами для аминокислотных замен F39P, F57N, L77D и L128S.

<400> 9

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 20 25 30

5 Asn Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 35 40 45

10 Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
 50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Asp His Leu Leu
 65 70 75 80

15 Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
 85 90 95

20 Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
 100 105 110

25 Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ser
 115 120 125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 130 135 140

30 Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150

35 <210> 10
 <211> 462
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

40 <220>
 <223> Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая продуцируемый бактериями деиммунизированный IL-7, оптимизированный по кодонам для E. coli, с кодонами для аминокислотных замен K68D, M69D, I88T, V96G.

45 <400> 10
 atggactgcg acatcgaagg taaagacggc aaacagtacg aatccgttct gatggtttcc 60

50

atcgaccagc tgctggactc catgaaagaa atcggctcca actgcctgaa caacgaattc 120
 aacttcttca aacggcacat atgcgacgct aacaagaag gcatgttctt gttccgcgct 180
 5 gctcgcaaac tgcgccagtt cctggatgat aactctaccg gtgacttoga cctgcacctg 240
 ctgaaagttt ctgaaggtag tactaccctg ctgaactgca ctggccaggg taaaggccgc 300
 aagccggccg ctctgggcca agctcagccg actaaatctc tagaagaaaa caaatccctg 360
 10 aaagaacaga agaagctgaa cgacctgtgc ttctgaaac gcctgctgca ggaaatcaaa 420
 acttgctgga acaaaatcct gatgggcact aaagaacact ag 462

15 <210> 11
 <211> 459
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

20 <220>
 <223> Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая
 деиммунизированный вариант зрелого IL-7 с кодонами для аминокислотных замен
 K68D, M69D, I88T, V96G.

25 <400> 11
 gattgtgata tgaaggtaa agatggcaaa caatatgaga gtgttctaat ggtcagcatc 60
 gatcaattat tggacagcat gaaagaaatt gtagcaatt gcctgaataa tgaatttaac 120
 tttttaaaa gacatatctg tgatgctaata aaggaaggta tgttttatt cctgtctgct 180
 30 cgcaagtga ggcaatttct tgacgataat agcactgggtg atttgatct ccactatta 240
 aaagtttcag aaggcacaac aaccctgttg aactgactg gccagggcaa aggaagaaaa 300
 ccagctgccc tgggtgaagc ccaaccaaca aagagtttg aagaaaataa atctttaaag 360
 35 gaacagaaaa aactgaatga cttgtgttc ctaaagagac tattacaaga gataaaaact 420
 tgttgaata aaatttgat gggcactaaa gaacactga 459

40 <210> 12
 <211> 384
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

45

50

<220>

<223> Аминокислотная последовательность для человеческого Fc-гамма1-IL-7.

<400> 12

5

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

10

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

20

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

25

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

30

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

35

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

40

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

45

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

50

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

5 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

10 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp
 225 230 235 240

15 Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu
 245 250 255

20 Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn
 260 265 270

25 Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu
 275 280 285

Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr
 290 295 300

30 Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile
 305 310 315 320

35 Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu
 325 330 335

Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys
 340 345 350

40 Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln
 355 360 365

45 Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 370 375 380

50

<210> 13
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

5

<220>
 <223> Аминокислотная последовательность для человеческого Fc-гамма2(h)(FN>AQ)-IL-7.

10

<400> 13

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25 30

20

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 50 55 60

25

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ala
 65 70 75 80

30

Gln Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 85 90 95

35

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 115 120 125

40

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 130 135 140

45

50

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155 160

5 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 165 170 175

10 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205

15 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 210 215 220

20 Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly
 225 230 235 240

25 Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp
 245 250 255

Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe
 260 265 270

30 Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe
 275 280 285

35 Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly
 290 295 300

Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu
 305 310 315 320

40 Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly
 325 330 335

45 Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu
 340 345 350

50

Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu
 355 360 365

5 Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 370 375 380

<210> 14

<211> 398

10 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

15 <223> Аминокислотная последовательность для человеческого Fc-гамма1-(линкер1)-IL-7

<400> 14

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

20

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

25

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

35

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

40

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

45

50

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

5 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

10 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

15 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

20 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

25 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 225 230 235 240

30 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys
 245 250 255

35 Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser
 260 265 270

Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe
 275 280 285

40 Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg
 290 295 300

45

50

Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp
 305 310 315 320

5 Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu
 325 330 335

10 Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu
 340 345 350

Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln
 355 360 365

15 Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile
 370 375 380

20 Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 385 390 395

25 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептидный линкер.

30 <400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

35 <210> 16
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

40 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность для человеческого Fc-гамма1(YN>AQ)-
 (линкер2)-IL-7.

<400> 16

45

50

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

5 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

10 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

15 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

20 Ala Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

25 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

30 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

35 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

40 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

45

50

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

5 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

10 Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val
 245 250 255

15 Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
 260 265 270

20 Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
 275 280 285

25 Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
 290 295 300

Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
 305 310 315 320

30 Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
 325 330 335

35 Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
 340 345 350

Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
 355 360 365

40 Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn
 370 375 380

45

50

Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
385 390

5 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

10 <220>
 <223> Полипептидный линкер.

 <400> 17

15 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

20 <210> 18
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

25 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность для человеческого Fc-гамма1(YN>AQ,d)-
 (линкер2)-IL-7.

 <400> 18

30 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

35 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

40 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

45 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

50 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

55

60

Ala Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

5 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

10 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

15 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

20 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

25 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

30 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

35 Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp
225 230 235 240

Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met
245 250 255

40 Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn
260 265 270

45

50

Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala
 275 280 285

5 Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln
 290 295 300

10 Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys
 305 310 315 320

Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys
 325 330 335

15 Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu
 340 345 350

20 Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys
 355 360 365

25 Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile
 370 375 380

Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 385 390

30 <210> 19
 <211> 911
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

35 <220>
 <223> Нуклеиново-кислотная последовательность для человеческого Fc-гамма1.

<400> 19
 gagcccaaat ctctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag 60

40 gcctgcccct ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag 120

gccccagccg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg 180

45 gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac 240

50

ccctgaggtc acatgctgg tggggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa 300
 ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta 360
 5 caacagcacg taccggtgg tcagcgtcct cacogtctg caccaggact ggctgaatgg 420
 caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctcca gccccatcg agaaaacct 480
 ctccaaagcc aaaggtggga cccgtgggt gcgagggcca catggacaga ggccggctcg 540
 10 gcccaccctc tgccctgaga gtgaccgtg taccaacctc tgccttaca gggcagcccc 600
 gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cacgggagga gatgaccaag aaccaggta 660
 gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca 720
 15 atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccg tctggactcc gacggctct 780
 tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgttct 840
 catgctcgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc gccaccgca 900
 20 ccccgggcgc c 911

<210> 20
 <211> 911
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Нуклеиново-кислотная последовательность для человеческого Fc-
 30 гамма1(YN>AQ).

<400> 20
 gagcccaaat ctctgaca aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag 60
 35 gcctgccct ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccaggacag 120
 gcccagccg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttc tcagcacctg aactcctggg 180
 gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac 240
 40 ccctgaggtc acatgctgg tggggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa 300
 ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcaggc 360
 ccagagcacg taccggtgg tcagcgtcct cacogtctg caccaggact ggctgaatgg 420
 45

50

caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcca gccccatcg agaaaacat 480
ctccaaagcc aaaggtgga cccgtgggt gcgaggcca catggacaga ggccggctcg 540
5 gcccaccctc tgccctgaga gtgaccgctg taccaacctc tglccctaca gggcagcccc 600
gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cacgggagga gatgaccaag aaccaggcca 660
gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca 720
10 atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctct 780
tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtctct 840
catgctcctg gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc gccaccgca 900
15 ccccgggcgc c 911

<210> 21
<211> 908
20 <212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиново-кислотная последовательность для человеческого Fc-гамма2(h).
25

<400> 21
gagcccaaat ctctgaca aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag 60
gcctcgccct ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag 120
30 gcccagctg ggtgctgaca cgtccacctc catctctcc tcagcaccac ctgtggcagg 180
accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc 240
tgaggtcacg tgctggtg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggctc agttcaactg 300
35 gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccaaggagg agcagttcaa 360
cagcacgttc cgtgtgtca gctcctcac cgtgtgcac caggactggc tgaacggcaa 420
ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc 480
40 caaaacaaa ggtgggacc gcggggtatg agggccacat ggacagaggc cggctcggcc 540
caccctctgc cctgagagt accgctgtac caacctctgt ccctacaggg cagccccgag 600
45 aaccacaggt gtacaccctg ccccatcac gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc 660

50

tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg 720
 ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac ggctccttct 780
 5 tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat 840
 gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcgcс accgcgaccc 900
 cgggcgcс 908
 10
 <210> 22
 <211> 908
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 15
 <220>
 <223> Нуклеиново-кислотная последовательность для человеческого Fc-
 гамма2(h)(FN>AQ).
 20
 <400> 22
 gagcccaaat cttctgaca aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag 60
 gcctcgcct ccagctcaag gcgggacagg tgccttagag tagcctgcat ccagggacag 120
 gcccagctg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcaccac ctgtggcagg 180
 25 accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc 240
 tgaggtcaag tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg 300
 gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcaggccca 360
 30 gagcacgttc cgtgtgttca gcgtcctcac cgtgtgtcac caggactggc tgaacggcaa 420
 ggagtacaag tgcaaggctt ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc 480
 35 caaaaccaaa ggtgggaccc gcggggtatg agggccacat ggacagaggc cggctcggcc 540
 caccctctgc cctgagagtg accgctgtac caacctctgt cctacaggg cagccccgag 600
 aaccacaggt gtacaccctg ccccatcac gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc 660
 40 tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg 720
 ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac ggctccttct 780
 45 tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat 840
 50

gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcgcc accgcgaccc 900

cgggtgca 908

5

<210> 23
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

10

<220>
 <223> Аминокислотная последовательность для зрелого человеческого
 деиммунизированного IL-7.1.

<400> 23

15

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 1 5 10 15

20

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Asp Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 20 25 30

25

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Ala Phe Leu Lys Arg Ala Ser Glu Lys Leu Arg
 50 55 60

30

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
 65 70 75 80

35

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
 85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
 100 105 110

40

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
 115 120 125

45

50

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 130 135 140

5 Ile Leu Lys Gly Ser
 145

<210> 24
 <211> 450
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая зрелый человеческий
 15 деиммунизированный IL-7.1.

<400> 24
 gattgtgata ttgaaggtaa agatggcaaa caatatgaga gtgttctaataat ggtcagcatc 60
 gatcaattag acgacagcat gaaagaaatt ggtagcaatt gcctgaataa tgaatttaac 120
 20 tttttaaaa gacatatctg tgatgctaataat aaggaagggtg ccttttaaaa gcgtgcttcc 180
 gagaagttga ggcaatttct taaaatgaat agcactgggtg atttggatct ccacttatta 240
 25 aaagtttcag aaggcacaac aatactgttg aactgcactg gccagggttaa aggaagaaaa 300
 ccagctgccc tgggtgaagc ccaaccaaca aagagtttgg aagaaaataa atctttaaag 360
 gaacagaaaa aactgaatga cttgtgtttc ctaaagagac tattacaaga gataaaaaact 420
 30 tgttgaata aaattttgaa aggcagctga 450

<210> 25
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Аминокислотная последовательность для зрелого человеческого
 40 деиммунизированного IL-7.2.

<400> 25

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 1 5 10 15

45

50

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 20 25 30

5 Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 35 40 45

10 Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
 50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asn Asp His Leu Leu
 65 70 75 80

15 Lys Val Ser Glu Gly Thr Gln Thr Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Gly
 85 90 95

20 Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
 100 105 110

25 Leu Glu Glu Asn Lys Ser Ser Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Val
 115 120 125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 130 135 140

30 Ile Leu Lys Gly Ser
 145

35 <210> 26
 <211> 450
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

40 <220>
 <223> Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая зрелый человеческий
 деиммунизированный IL-7.2.

<400> 26
 gatttgata ttgaaggtaa agatggcaaa caatagaga gtgttctaat ggtcagcatc 60

45

50

gatcaattat tggacagcat gaaagaaatt ggtagcaatt gctgaataa tgaatttaac 120
 tttttaaaa gacatatctg tgatgctaata aaggaaggta tgttttatt ccgtgctgct 180
 5 cgcaagttga ggcaatttct taaaatgaat agcactgggtg attttaacga tcactatta 240
 aaagtttcag aaggcacaca gacactcttg aactgcaactg gccagggcaa aggaagaaaa 300
 ccagctgccc tgggtgaagc ccaaccaaca aagagtttg aagaaaataa atcttctaag 360
 10 gaacagaaaa aactgaatga cgtgtgttc ctaaagagac tattacaaga gataaaaact 420
 tgttgaata aaatttgaa aggcagctga 450

15 <210> 27
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

20 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность для зрелого человеческого
 деиммунизированного IL-7.3.

<400> 27

25 Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Asp Asp Ser Met Lys Glu Thr Gly Ser
 20 25 30

30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 35 40 45

35

Ala Asn Lys Glu Gly Ala Phe Leu Lys Arg Ala Ser Glu Lys Leu Arg
 50 55 60

40

Gln Phe Leu Asp Asp Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Asp His Leu Leu
 65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Gln Thr Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Gly
 85 90 95

45

50

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
 100 105 110

5 Leu Glu Glu Asn Lys Ser Ser Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 115 120 125

10 Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 130 135 140

Ile Leu Lys Gly Ser
 145

15 <210> 28
 <211> 450
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

20 <220>
 <223> Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая зрелый человеческий
 Del-IL-7.3.

25 <400> 28
 gattgtgata ttgaaggtaa agatggcaaa caatatgaga gtgttctaata ggtcagcatc 60
 gatcaattag acgacagcat gaaagaaacc ggtagcaatt gcctgaataa tgaacctaac 120
 tttttaaaa gacatatctg tgatgctaata aaggaaggtg ccttttaaa gcgtgctcc 180
 30 gagaagttga ggcaatttct tgacgataat agcactgggtg atttgatga ccacttatta 240
 aaagtttcag aaggcacaca gacactcttg aactgcactg gccagggcaa aggaagaaaa 300
 ccagctgccc tgggtgaagc ccaaccaaca aagagtttgg aagaaaataa atcttctaag 360
 35 gaacagaaaa aactgaatga cgctgtttc ctaaagagac tattacaaga gataaaaaact 420
 tgttgaata aaatttgaa aggcagctga 450

40 <210> 29
 <211> 502
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

45

50

<220>

<223> Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая линкерную последовательность GGGGSGGGG, за которой следует зрелый человеческий IL-7, содержащий аминокислотные замены F39P, F57N и L128S.

5

<400> 29

ccccgggtgct ggaggtggag gatcaggtgg tggcgggtgat tgtgatattg agggttaagga 60

tggcaaacag tacgagagtg ttctaattgt gagcatcgac cagtattgg acagcatgaa 120

10

ggagattggg agcaattgcc tgaataacga acccaacttc ttaagagac acatctgcga 180

tgccaataag gaagggatgt tttaaaccg tgctgcccgc aagttgaggc aattccttaa 240

aatgaacagc actggtgact ttgatctcca cctgttaaaa gtttcagaag gcaccacaat 300

15

cctgttgaac tgactggcc aggtgaaagg aaggaaacct gctgccctgg gtgaagctca 360

accaacaaag agttggagg agaataaatc tttaaaggaa cagaaaaaac tgaatgacag 420

20

ctgttccta aagagactac tgcaagagat aaaaacttgc tggaataaaa tcttgatggg 480

сactaaagaa сactgactcg ag 502

<210> 30

25

<211> 1394

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

30

<223> Нуклеиново-кислотная последовательность зрелого человеческого Fсгамма2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S).

<400> 30

gagcccaaat ctctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag 60

35

gcctcgccct ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag 120

gccccagctg ggtgctgaca cgtccacctc catctctcc tcagcaccac ctgtggcagg 180

accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc 240

40

tgaggtcacg tgcgtggagg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agtcaactg 300

gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcaggccca 360

45

gagcacgttc cgtgtgtgca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa 420

50

ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc 480
 caaaacaaa ggtgggaccc gcgggggatg agggccacat ggacagaggc cggctcggcc 540
 5 caccctctgc cctgagagtg accgctgtac caacctctgt ccctacaggg cagccccgag 600
 aaccacaggt gtacaccctg ccccatcac gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc 660
 tgacctgctt ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg 720
 10 ggacagccga gaacaactac aagaccacac ctccatgct ggactccgac ggctccttct 780
 tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat 840
 gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcgc accgcgaccc 900
 15 cgggtgctgg aggtggagga tcaggtggtg gcggtgattg tgatattgag ggtaaggatg 960
 gcaaacagta cgagagtgtt ctaatggtga gcatcgacca gttattggac agcatgaagg 1020
 agattgggag caattgcctg aataacgaac ccaacttct taagagacac atctgcgatg 1080
 20 ccaataagga agggatgttt taaaccgtg ctgcccgcaa gttgaggcaa ttcttaaaa 1140
 tgaacagcac tggtgacttt gatgaccacc tgttaaaagt ttcagaaggc accacaatcc 1200
 25 tgttgaactg cactggccag gtgaaaggaa ggaacctgc tgccctgggt gaagctcaac 1260
 caacaaagag ttggaggag aataaatctt taaaggaaca gaaaaaactg aatgacagct 1320
 gtttcctaaa gagactactg caagagataa aaactgctg gaataaaatc ttgatgggca 1380
 30 ctaaagaaca ctga 1394

<210> 31
 <211> 1394
 35 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеиново-кислотная последовательность зрелого человеческого
 40 Fсгамма2(h)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L128S).
 <400> 31
 gagcccaaat ctctgасаа аactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag 60
 45 gcctcgccct ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag 120

50

gccccagctg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcaccac ctgtggcagg 180
 accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc 240
 5 tgaggtcacg tgcgtggagg tggacgtgag cacgaagac cccgaggtcc agtcaactg 300
 gtacgtggac ggcgaggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa 360
 cagcacgttc cgtgtggta gcgtctcac cgtgtgac caggactggc tgaacggcaa 420
 10 ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc 480
 caaaacaaa ggtgggaccc gcggggtatg agggccacat ggacagaggc cggctcggcc 540
 caccctctgc cctgagagtg accgctgtac caacctgt cctacaggg cagccccgag 600
 15 aaccacaggt gtacaccctg ccccatcac gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc 660
 tgacctgctt ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaatg 720
 ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctccatgct ggactccgac ggctcctct 780
 20 tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat 840
 gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcgc accgcgaccc 900
 25 cgggtgctgg aggtggagga tcaggtggg gcggtgattg tgatattgag ggtaaggatg 960
 gcaaacagta cgagagtgtt ctaatgggta gcatcgacca gtattggac agcatgaagg 1020
 agattgggag caattgcctg aataacgaac ccaactctt taagagacac atctgcgatg 1080
 30 ccaataagga agggatgtt taaaccgtg ctgcccgcaa gttgaggcaa ttcttaaaa 1140
 tgaacagcac tggtagctt gatctccacc tgtaaaagt ttcagaaggc accacaatcc 1200
 tgtgaactg cactggccag gtgaaaggaa ggaaacctgc tgccctgggt gaagctcaac 1260
 35 caacaagag ttggaggag aataaatctt taaaggaaca gaaaaaactg aatgacagct 1320
 gttcctaaa gagactactg caagagataa aaactgctg gaataaaatc ttgatgggca 1380
 40 ctaaagaaca ctga 1394

<210> 32
 <211> 1394
 <212> ДНК
 45 <213> Искусственная последовательность

50

<220>

<223> Нуклеиново-кислотная последовательность зрелого
huFсгамма2(h)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L77D и L128S).

5 <400> 32
gagcccaaat ctctgасаа ааtсаасаа tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag 60
gcctcgccct ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag 120
10 gcccagctg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttc tcagcaccac ctgtggcagg 180
accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc 240
tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtec agtcaactg 300
15 gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa 360
cagcacgttc cgtgtgtca gcgtctcac cgtgtgcac caggactggc tgaacggcaa 420
ggagtacaag tgcaaggct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc 480
20 caaaaccaaa ggtgggaccc gcggggatg agggccacat ggacagaggg cggctcggcc 540
cacctctgc cctgagagt accgctgtac caacctctgt ccctacaggg cagccccgag 600
aaccacaggt gtacaccctg cccccatcac gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc 660
25 tgacctgct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcg cgtggagtgg gagagcaatg 720
ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctccatgct ggactccgac ggctcctct 780
tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcagggtgca gcaggggaac gtcttctcat 840
30 gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcgcc acccgacccc 900
cgggtgctgg aggtggagga tcagggtgtg gcggtgattg tgatattgag ggtaaggatg 960
gcaaacagta cgagagtgtt ctaatggtga gcatcgacca gttattggac agcatgaagg 1020
35 agattgggag caattgcctg aataacgaac ccaacttct taagagacac atctgcatg 1080
ccaataagga agggatgtt taaaccgtg ctgcccgaа gtgaggcaa ttccttaaaa 1140
40 tgaacagcac tggtgacttt gatgaccacc tgttaaagt tcagaaggc accacaatcc 1200
tgttgaactg cactggccag gtgaaaggaa ggaaacctgc tgccctgggt gaagctcaac 1260
caacaaagag ttggaggag aataaatctt taaaggaaca gaaaaaactg aatgacagct 1320
45

50

gtttcctaaa gagactactg caagagataa aaacttgctg gaataaaatc ttgatgggca 1380

ctaaagaaca ctga 1394

5

<210> 33
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

10

<220>
 <223> Аминокислотная последовательность зрелого человеческого
 Fсгамма2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S).

<400> 33

15

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

20

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 35 40 45

25

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 50 55 60

30

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ala
 65 70 75 80

35

Gln Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 100 105 110

40

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 115 120 125

45

50

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 130 135 140

5 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155 160

10 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 165 170 175

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 180 185 190

15 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205

20 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 210 215 220

25 Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 245 250 255

30 Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 260 265 270

35 Asn Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 275 280 285

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
 290 295 300

40 Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Asp His Leu Leu
 305 310 315 320

45

50

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
 325 330 335

5 Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
 340 345 350

10 Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ser
 355 360 365

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 370 375 380

15 Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 385 390

20 <210> 34
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

25 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность зрелого человеческого
 Fсгамма2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L128S).

<400> 34

30 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

35 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 35 40 45

40 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 50 55 60

45 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ala
 65 70 75 80

50

Gln Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 85 90 95

5 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 100 105 110

10 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 130 135 140

15 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155 160

20 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 165 170 175

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 180 185 190

25 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205

30 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 210 215 220

35 Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 245 250 255

40 Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 260 265 270

45

50

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 275 280 285

5 Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
 290 295 300

10 Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
 305 310 315 320

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
 325 330 335

15 Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
 340 345 350

20 Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ser
 355 360 365

25 Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 370 375 380

Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 385 390

30 <210> 35
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

35 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность зрелого человеческого
 Ггамма2(h)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S).

<400> 35

40 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

45

50

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25 30

5 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 35 40 45

10 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 50 55 60

15 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 65 70 75 80

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 85 90 95

20 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 100 105 110

25 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 130 135 140

30 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155 160

35 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 165 170 175

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 180 185 190

40 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205

45

50

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 210 215 220

5 Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

10 Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 245 250 255

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 260 265 270

15 Asn Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 275 280 285

20 Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
 290 295 300

25 Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Asp His Leu Leu
 305 310 315 320

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
 325 330 335

30 Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
 340 345 350

35 Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ser
 355 360 365

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 370 375 380

40 Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 385 390

45

50

<210> 36
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

5

<220>
 <223> Аминокислотная последовательность зрелого человеческого Fсгамма2(h)
 (линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L128S).

10

<400> 36

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25 30

20

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 50 55 60

25

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 65 70 75 80

30

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 85 90 95

35

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 115 120 125

40

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 130 135 140

45

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155 160

50

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 165 170 175

5 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 180 185 190

10 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 210 215 220

15 Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

20 Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 245 250 255

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 260 265 270

25 Asn Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 275 280 285

30 Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
 290 295 300

35 Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
 305 310 315 320

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
 325 330 335

40 Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
 340 345 350

45

50

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ser
 355 360 365

5 Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 370 375 380

10 Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 385 390

<210> 37
 <211> 152
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 37

20 Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 20 25 30

25 Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 35 40 45

30 Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
 50 55 60

35 Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
 65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
 85 90 95

40 Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
 100 105 110

45

50

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
 115 120 125

5 Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 130 135 140

10 Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150

15 <210> 38
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

<400> 38

20 Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe
 1 5 10 15

Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg
 20 25 30

25 Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp
 35 40 45

30 Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu
 50 55 60

35 Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu
 65 70 75 80

Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln
 85 90 95

40 Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile
 100 105 110

45 Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 115 120 125

50

<210> 39
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Papio sp.

5

<400> 39

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 1 5 10 15

10

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 20 25 30

15

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Leu Cys Asp
 35 40 45

20

Asp Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
 50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
 65 70 75 80

25

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Lys Val
 85 90 95

30

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Pro Thr Lys Ser
 100 105 110

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ser
 115 120 125

35

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Lys Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 130 135 140

40

Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150

45

50

<210> 40
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Macaca mulatta

5

<400> 40

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 1 5 10 15

10

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 20 25 30

15

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Leu Cys Asp
 35 40 45

20

Asp Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
 50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
 65 70 75 80

25

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Lys Val
 85 90 95

30

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Pro Thr Lys Ser
 100 105 110

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Ser
 115 120 125

35

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Lys Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 130 135 140

40

Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150

45

<210> 41
 <211> 151

50

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 41

5

Asp Cys Asp Ile Ser Gly Lys Asp Gly Gly Ala Tyr Gln Asn Val Leu
 1 5 10 15

10

Met Val Asn Ile Asp Asp Leu Asp Asn Met Ile Asn Phe Asp Ser Asn
 20 25 30

15

Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn Phe Phe Lys Lys His Ser Cys Asp Asp
 35 40 45

20

Asn Lys Glu Ala Ser Phe Leu Asn Arg Ala Ser Arg Lys Leu Arg Gln
 50 55 60

Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser Asp Asp Phe Lys Leu His Leu Ser Thr
 65 70 75 80

25

Val Ser Gln Gly Thr Leu Thr Leu Leu Asn Cys Thr Ser Lys Gly Lys
 85 90 95

30

Gly Arg Lys Pro Pro Ser Leu Ser Glu Ala Gln Pro Thr Lys Asn Leu
 100 105 110

Glu Glu Asn Lys Ser Ser Lys Glu Gln Lys Lys Gln Asn Asp Leu Cys
 115 120 125

35

Phe Leu Lys Ile Leu Leu Gln Lys Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile
 130 135 140

40

Leu Arg Gly Ile Lys Glu His
 145 150

45

<210> 42
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

50

<400> 42

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Gly Val Tyr Gln Asn Val Leu
 1 5 10 15

5

Met Val Ser Ile Asp Asp Leu Asp Arg Met Ile Asp Phe Asp Ser Asn
 20 25 30

10

Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn Phe Leu Lys Lys His Ser Cys Asp Asp
 35 40 45

15

Asn Lys Glu Ala Ser Phe Leu Tyr Arg Ala Ala Arg Lys Leu Lys Gln
 50 55 60

Phe Ile Lys Met Asn Ile Ser Glu Glu Phe Asn His His Leu Ser Thr
 65 70 75 80

20

Val Ser Gln Gly Thr Leu Thr Leu Phe Asn Cys Thr Ser Lys Val Lys
 85 90 95

25

Gly Arg Lys Pro Pro Ser Leu Gly Glu Ala Gln Leu Thr Lys Asn Leu
 100 105 110

Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Arg Gln Gly Asp Leu Cys
 115 120 125

30

Phe Leu Lys Ile Leu Leu Gln Lys Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile
 130 135 140

35

Leu Arg Gly Ala Lys Glu Tyr
 145 150

40

<210> 43
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

45

<400> 43

50

Asp Cys Asp Phe Ser Gly Lys Asp Gly Gly Ala Tyr Gln Asn Val Leu
 1 5 10 15

5 Met Val Ser Ile Asp Asp Leu Asp Asn Met Ile Asn Phe Asp Ser Asn
 20 25 30

10 Cys Leu Asn Asn Glu Pro Asn Phe Phe Lys Lys His Ser Cys Asp Asp
 35 40 45

Asn Lys Glu Ala Ser Phe Leu Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Lys Gln
 50 55 60

15 Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser Asp Asp Phe Lys Leu His Leu Ser Thr
 65 70 75 80

20 Val Ser Gln Gly Thr Leu Thr Leu Leu Asn Cys Thr Ser Lys Gly Lys
 85 90 95

25 Gly Arg Lys Pro Pro Ser Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Asn Leu
 100 105 110

Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Arg Lys Gln Asn Asp Leu Cys
 115 120 125

30 Phe Leu Lys Ile Leu Leu Gln Lys Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile
 130 135 140

35 Leu Arg Gly Ile Thr Glu His
 145 150

40 <210> 44
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 44

45

50

Asp Cys His Ile Lys Asp Lys Asp Gly Lys Ala Phe Gly Ser Val Leu
 1 5 10 15

5 Met Ile Ser Ile Asn Gln Leu Asp Lys Met Thr Gly Thr Asp Ser Asp
 20 25 30

10 Cys Pro Asn Asn Glu Pro Asn Phe Phe Lys Lys His Leu Cys Asp Asp
 35 40 45

Thr Lys Glu Ala Ala Phe Leu Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln
 50 55 60

15 Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser Glu Glu Phe Asn Asp His Leu Leu Arg
 65 70 75 80

20 Val Ser Asp Gly Thr Gln Thr Leu Val Asn Cys Thr Ser Lys Glu Glu
 85 90 95

Lys Thr Ile Lys Glu Gln Lys Lys Asn Asp Pro Cys Phe Leu Lys Arg
 100 105 110

25 Leu Leu Arg Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Lys Gly Ser
 115 120 125

30 Ile

35 <210> 45
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 45

40 Glu Cys His Ile Lys Asp Lys Glu Gly Lys Ala Tyr Glu Ser Val Leu
 1 5 10 15

45 Met Ile Ser Ile Asp Glu Leu Asp Lys Met Thr Gly Thr Asp Ser Asn
 20 25 30

50

Cys Pro Asn Asn Glu Pro Asn Phe Phe Arg Lys His Val Cys Asp Asp
 35 40 45

5 Thr Lys Glu Ala Ala Phe Leu Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Lys Gln
 50 55 60

10 Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser Glu Glu Phe Asn Val His Leu Leu Thr
 65 70 75 80

Val Ser Gln Gly Thr Gln Thr Leu Val Asn Cys Thr Ser Lys Glu Glu
 85 90 95

15 Lys Asn Val Lys Glu Gln Lys Lys Asn Asp Ala Cys Phe Leu Lys Arg
 100 105 110

20 Leu Leu Arg Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Lys Gly Ser
 115 120 125

Ile

25

<210> 46
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 46

Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
 1 5 10 15

35

Ser Leu

40

<210> 47
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

45

50

<220>

<223> N-концевая последовательность продуцируемого бактериями человеческого белка IL-7.

5 <400> 47

Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys

1 5

10 <210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

15 <220>

<223> Т-клеточный эпитоп, присутствующий в IL-7, включая положение 70.

<400> 48

20 Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser

1 5

<210> 49

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Т-клеточный эпитоп, присутствующий в IL-7, включая положение 70.

30 <400> 49

Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp

1 5

35 <210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

40 <220>

<223> Т-клеточный эпитоп, присутствующий в IL-7, включая положение 70.

<400> 50

45

50

Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe

1 5

5 <210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

10 <220>
<223> Т-клеточный эпитоп, присутствующий в IL-7, включая положение 70.

<400> 51

Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu

15 1 5

20 <210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Т-клеточный эпитоп, присутствующий в IL-7, включая положение 91.

25 <400> 52

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val

1 5

30 <210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

35 <220>
<223> Т-клеточный эпитоп, присутствующий в IL-7, включая положение 91.

<400> 53

Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys

40 1 5

45 <210> 54
<211> 4
<212> PRT

50

5
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Сайт гликозилирования в участке Fc IgG1.
<400> 54
Gln Tyr Asn Ser
1
10
<210> 55
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
15
<220>
<223> Сайт гликозилирования в участке Fc IgG1.
<400> 55
20
Gln Phe Asn Ser
1
25
<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
30
<220>
<223> Сайт гликозилирования в участке Fc IgG1.
<400> 56
Gln Ala Gln Ser
1
35
<210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
40
<220>
<223> Последовательность около С-конца участка Fc.
<400> 57
45
50

Leu Ser Leu Ser

1

5

<210> 58

<211> 4

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

10

<223> Модифицированная последовательность около С-конца участка Fc.

<400> 58

Ala Thr Ala Thr

1

15

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

20

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид, имеющий происхождение от столбнячного токсина.

<400> 59

25

Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile

1

5

10

30

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

35

<223> Пептид, содержащий Т-клеточный эпитоп.

<400> 60

Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp

1

5

10

15

40

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

45

50

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид, содержащий Т-клеточный эпитоп.

5

<400> 61

Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu
1 5 10 15

10

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

15

<220>

<223> Пептид, содержащий Т-клеточный эпитоп.

<400> 62

20

Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
1 5 10 15

25

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность варианта пептида IL-7.

30

<400> 63

Leu Arg Gln Phe Leu Asp Asp Asn Ser
1 5

35

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

40

<220>

<223> Последовательность варианта пептида IL-7.

<400> 64

45

50

Thr Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Gly

1 5

5

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

10

<220>

<223> Пептид, содержащий Т-клеточный эпитоп.

<400> 65

Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu Cys

15

1 5 10 15

<210> 66

<211> 16

<212> PRT

20

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид, содержащий Т-клеточный эпитоп.

<400> 66

25

Cys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu

1 5 10 15

30

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

35

<220>

<223> Последовательность, содержащая сайт гликозилирования.

<400> 67

Met Asn Ser Thr Gly

40

1 5

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

45

50

Формула изобретения

1. Полипептид, обладающий активностью интерлейкина-7, содержащий модифицированную молекулу человеческого IL-7, в которой Т-клеточный эпитоп модифицирован для снижения Т-клеточного ответа против IL-7, где указанный полипептид также содержит участок Fc молекулы иммуноглобулина, слитый через свой С-конец с N-концом указанной модифицированной молекулы IL-7, где указанная слитая молекула Fc-IL-7 выбрана из группы, состоящей из
- i. huFc γ 2(h)(FN>AQ)-L-IL-7(F39P, F57N, L128S), где Fc γ 2(h) представляет собой участок человеческого Fc с шарнирной областью IgG1 и доменами CH2 и CH3 IgG2, содержащий мутации F296A и N297Q, L представляет собой линкер последовательности GGGGSGGGG, а IL-7(F39P, F57N, L128S) обозначает IL-7, содержащий мутации F39P, F57N и L128S, причем указанная молекула имеет последовательность, представленную на фиг.32 (SEQ ID NO.34);
 - ii. huFc γ 2(h)(FN>AQ)-L-IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S), где Fc γ 2(h) представляет собой участок человеческого Fc с шарнирной областью IgG1 и доменами CH2 и CH3 TgG2, содержащий мутации F296A и N297Q, L представляет собой линкер последовательности GGGGSGGGG, а IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S) обозначает IL-7, содержащий мутации F39P, F57N, L77D и L128S, причем указанная молекула имеет последовательность, представленную на фиг.31 (SEQ ID NO.33);
 - iii. huFc γ 2(h)-L-IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S), где Fc γ 2(h) представляет собой участок человеческого Fc с шарнирной областью IgG1 и доменами CH2 и CH3 IgG2, L представляет собой линкер последовательности GGGGSGGGG, а IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S) обозначает IL-7, содержащий мутации F39P, F57N, L77D и L128S, причем указанная молекула имеет последовательность, представленную на фиг.33 (SEQ ID NO.35);
 - iv. huFc γ 2(h)-L-IL-7(F39P, F57N, L128S), где Fc γ 2(h) представляет собой участок человеческого Fc с шарнирной областью IgG1 и доменами CH2 и CH3 TgG2, L представляет собой линкер последовательности GGGGSGGGG, а IL-7(F39P, F57N, L128S) обозначает IL-7, содержащий мутации F39P, F57N и L128S, причем указанная молекула имеет последовательность, представленную на фиг.34 (SEQ ID NO.36).
2. Полипептид по п.1, где указанная молекула иммуноглобулина представляет собой человеческий иммуноглобулин.
3. Полипептид по п.1 или 2, где указанная молекула иммуноглобулина представляет собой IgG2.
4. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по п.1.
5. Экспрессирующий вектор для клеток прокариот, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.4, оперативно связанную с регуляторными элементами.
6. Прокариотическая клетка для продуцирования полипептида по п.1, содержащая экспрессирующий вектор по п.5.
7. Фармацевтическая композиция для стимуляции иммунного ответа у пациента, содержащая эффективное количество полипептида по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.
8. Способ стимулирования иммунного ответа у пациента, при котором пациенту вводят фармацевтическую композицию по п.7 в количестве между 0,01 и 10 мг/кг/сутки.

Аминокислотная последовательность IL-7 быка

MFHVSRFYIFGIPPLILVLLPVASSDCDISGRDGGAYQNVLMVNIDDLNMINFD
 SNCLNNEPNFFKKHSCDDNKEASFLNRASRKLKQFLKMNISDDFKLHLSTVSQGTLL
 NCTSKGKGRKPPSLSEAQPTKNLEENKSSREQKKQNDLCFLKILLQKIKTCWNKILRGIK
 EH (SEQ ID NO:2)

Фиг. 2

Аминокислотная последовательность IL-7 овцы

MFHVSRFYIFGIPPLILVLLPVASSDCDFSGKDGAYQNVLMVSIIDDLNMINFD
 SNCLNNEPNFFKKHSCDDNKEASFLNRAARKLKQFLKMNISDDFKLHLSTVSQGTLL
 NCTSKGKGRKPPSLGEAQPTKNLEENKSLKEQRKQNDLCFLKILLQKIKTCWNKILRGIT
 EH (SEQ ID NO:3)

Фиг. 3

Аминокислотная последовательность деиммунизированного IL-7 человека

DCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGM
 FLFRAARKLRQFLDDNSTGDFDLHLLKVSEGTTLNCTGQKGKGRKPAALGEAQPTKSL
 EENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH (SEQ ID NO:4)

Фиг. 4

Аминокислотная последовательность продуцируемого бактериями деиммунизированного IL-7 человека

MDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEG
 MFLFRAARKLRQFLDDNSTGDFDLHLLKVSEGTTLNCTGQKGKGRKPAALGEAQPTK
 SLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH (SEQ ID NO:5)

Фиг. 5

Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая зрелый IL-7 с заменами кодонов для F39P, F57N и L128S (PNS)

GATTGTGATATTGAGGGTAAGGATGGCAAACAGTACGAGAGTGTCTAATGG
 TGAGCATCGACCAGTTATTGGACAGCATGAAGGAGATTGGGAGCAATTGCCTGAAT
 AACGAACCCAACCTTCTTTAAGAGACACATCTGCGATGCCAATAAGGAAGGGATGTTT
 TAAACCGTGCTGCCCGCAAGTTGAGGCAATTCCTTAAAATGAACAGCACTGGTGA
 CTTTGATCTCCACCTGTAAAAGTTTCAGAAGGCACCACAATCCTGTTGAACTGCAC
 TGGCCAGGTGAAAGGAAGGAAACCTGCTGCCCTGGGTGAAGCTCAACCAACAAAG
 AGTTTGAGGAGAATAAATCTTTAAGGAACAGAAAAAACTGAATGACAGCTGTTTC
 ТАААGAGACTACTGCAAGAGATAAAAACTTGCTGGAATAAATCTTGATGGGCACT
 AAAGAACAC (SEQ ID NO:6)

Фиг. 6

Аминокислотная последовательность зрелого IL-7 человека с кодонами для аминокислотных замен F39P, F57N и L128S (PNS)

DCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEPNFFKRHICDANKEGM
 FLNRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSL
 EENKSLKEQKKLNDSCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH
 (SEQ ID NO:7)

Фиг. 7

Аминокислотная последовательность для человеческого Fcy2(h)(FN>AQ)-IL-7

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSAT
ATPGADCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGM
FLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSL
EENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH (SEQ ID NO:13)

Фиг. 13

Аминокислотная последовательность для человеческого Fcy1-(линкер1)-IL-7

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSAT
ATPGAGGGGSGGGGSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNE
FNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVK
GRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH (SEQ
ID NO:14)

Фиг. 14

Аминокислотная последовательность для человеческого Fcy1(YN>AQ)-(линкер2)-IL-7

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSAT
ATPGAGGGGSGGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKR
HICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAAL
LGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH (SEQ ID
NO:16)

Фиг. 15

Аминокислотная последовательность для человеческого Fcy1(YN>AQ,d)-(линкер2)-IL-7

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSAT
ATPGGGGSGGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHI
CDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAAL
GEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH (SEQ ID NO:18)

Фиг. 16

Нуклеиново-кислотная последовательность для человеческого Fcy1

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAАCTCACACATGCCACCGTGCCCAGGTAAG
 CCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCT
 GCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTTCTCCT
 CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAАACCCAAG
 GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
 TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
 AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAA
 GGTGGGACCCGTGGGGTGCAGGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACC
 CTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGA
 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
 TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
 GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAАCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
 TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
 CGCAGAAGAGCGCCACCGCGACCCCGGGCGCC (SEQ ID NO:19)

Фиг. 17

Нуклеиново-кислотная последовательность для человеческогоFcy1(YN>AQ)

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAАCTCACACATGCCACCGTGCCCAGGTAAG
 CCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCT
 GCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTTCTCCT
 CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAАACCCAAG
 GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
 TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGGCCCAGAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
 AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAA
 GGTGGGACCCGTGGGGTGCAGGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACC
 CTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGA
 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
 TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
 GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAАCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
 TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
 CGCAGAAGAGCGCCACCGCGACCCCGGGCGCC (SEQ ID NO:20)

Фиг. 18

Нуклеиново-кислотная последовательность для человеческогоFcy2(h)

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGGTAAG
 CCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCT
 GCATCCAGGGACAGGCCCCAGCTGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCT
 CAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
 ACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
 TGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGC
 GTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
 TCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGT
 GGGACCCGCGGGGTATGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCTC
 TGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAA
 CCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
 GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
 GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCC
 GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACA
 CAGAAGAGCGCCACCGCGACCCCGGGCGCC (SEQ ID NO:21)

Фиг. 19

Нуклеиново-кислотная последовательность для человеческогоFcy2(h)(FN>AQ)

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGGTAAG
 CCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCT
 GCATCCAGGGACAGGCCCCAGCTGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCT
 CAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
 ACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
 TGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGGCCAGAGCACGTTCCGTGTGGTCAGC
 GTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
 TCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGT
 GGGACCCGCGGGGTATGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCTC
 TGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAA
 CCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
 GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
 GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCC
 GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACA
 CAGAAGAGCGCCACCGCGACCCCGGGTGCA (SEQ ID NO:22)

Фиг. 20

Аминокислотная последовательность для зрелого человеческогодеиммунизированного IL-7.1

DCDIEGKDGKQYESVLMVSIQDLDDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGA
 FLKRASEKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSL
 EENKSLKEQKLNLDLFLKRLLEIKTCWNKILKGS (SEQ ID NO:23)

Фиг. 21

Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая зрелый
человеческий деиммунизированный IL-7.1

GATTGTGATATTGAAGGTAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGG
TCAGCATCGATCAATTAGACGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATA
ATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGTGCCTTTTT
AAAGCGTGCTCCGAGAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAATGAATAGCACTGGTGATTT
TGATCTCCACTTATTTAAAAGTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGG
CCAGGTTAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGTT
TGGAAGAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAACTGAATGACTTGTGTTTCCTAAA
GAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTGGAAATAAAATTTTGAAAGGCAGCTGA
(SEQ ID NO:24)

Фиг. 22

Аминокислотная последовательность для зрелого человеческого
деиммунизированного IL-7.2

DCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGM
FLFRAARKLRQFLKMNSTGDFNDHLLKVSEGTQLLNCTGQGKGRKPAALGEAQPTKS
LEENKSSKEQKLLNDVCFLKRLLEIKTCWNKILKGS (SEQ ID NO:25)

Фиг. 23

Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая зрелый
человеческий деиммунизированный IL-7.2

GATTGTGATATTGAAGGTAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGG
TCAGCATCGATCAATTATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATA
ATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGTATGTTTTTA
TTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAATGAATAGCACTGGTGATTTT
AACGATCACTTATTTAAAAGTTTCAGAAGGCACACAGACACTCTTGAAGTGCCTGGC
CAGGGCAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGTT
TGGAAGAAAATAAATCTTCTAAGGAACAGAAAAAACTGAATGACGTGTGTTTCCTAA
AGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTGGAAATAAAATTTTGAAAGGCAGCTGA
(SEQ ID NO:26)

Фиг. 24

Аминокислотная последовательность для зрелого человеческого
деиммунизированного IL-7.3

DCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLDDSMKETGSNCLNNEPNFFKRHICDANKEG
AFLKRASEKLRQFLDDNSTGDFDDHLLKVSEGTQLLNCTGQGKGRKPAALGEAQPTK
SLEENKSSKEQKLLNDACFLKRLLEIKTCWNKILKGS (SEQ ID NO:27)

Фиг. 25

Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая зрелый
человеческий Del-IL-7.3

GATTGTGATATTGAAGGTAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGG
TCAGCATCGATCAATTAGACGACAGCATGAAAGAAACCGGTAGCAATTGCCTGAATA
ATGAACCTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGTGCCTTTTT
AAAGCGTGCTCCGAGAAGTTGAGGCAATTTCTTGACGATAATAGCACTGGTGATTT
TGATGACCACTTATTTAAAAGTTTCAGAAGGCACACAGACACTCTTGAAGTGCCTGG
CCAGGGCAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGT
TTGGAAGAAAATAAATCTTCTAAGGAACAGAAAAAACTGAATGACGCCTGTTTCCTA
AAGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTGGAAATAAAATTTTGAAAGGCAGCTGA
(SEQ ID NO:28)

Фиг. 26

Нуклеиново-кислотная последовательность, кодирующая линкерную последовательность GGGGSGGGG, за которой следует зрелый человеческий IL-7, содержащий аминокислотные замены для F39P, F57N и L128S

CccgggtgctGGAGGTGGAGGATCAGGTGGTGGCGGTGATTGTGATATTGAGG
GTAAGGATGGCAAACAGTACGAGAGTGTCTAATGGTGAGCATCGACCAGTTATTG
GACAGCATGAAGGAGATTGGGAGCAATTGCCTGAATAACGAACCCAACTTCTTTAA
GAGACACATCTGCGATGCCAATAAGGAAGGGATGTTTTAAACCGTGCTGCCCGCA
AGTTGAGGCAATTCCTTAAAATGAACAGCACTGGTGACTTTGATCTCCACCTGTAA
AAGTTTCAGAAGGCACCACAATCCTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTGAAAGGAAGG
AAACCTGCTGCCCTGGGTGAAGCTCAACCAACAAGAGTTTGGAGGAGAATAAATC
TTTAAAGGAACAGAAAAAATGAATGACAGCTGTTTCTAAAGAGACTACTGCAAGA
GATAAAAATTTGCTGGAATAAAATCTTGATGGGCACTAAAGAACACTGActcgag (SEQ
ID NO: 29)

Фиг. 27

Нуклеиново-кислотная последовательность зрелого человеческого Fcy2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S)

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAATCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAG
CCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCT
GCATCCAGGGACAGGCCCCAGCTGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCT
CAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGGCCAGAGCACGTTCCGTGTGGTCAGC
GTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGT
GGGACCCGCGGGGTATGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCTC
TGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCGCCACC GCGACCCCGGGTGTGGAGGTGGAGGATCAGGTGGTGGC
GGTGATTGTGATATTGAGGGTAAGGATGGCAAACAGTACGAGAGTGTCTAATGGT
GAGCATCGACCAGTTATTGGACAGCATGAAGGAGATTGGGAGCAATTGCCTGAATA
ACGAACCCAACTTCTTTAAGAGACACATCTGCGATGCCAATAAGGAAGGGATGTTTT
TAAACCGTGCTGCCCGCAAGTTGAGGCAATTCCTTAAAATGAACAGCACTGGTGAC
TTTGATGACCACCTGTTAAAAGTTTCAGAAGGCACCACAATCCTGTTGAACTGCACT
GGCCAGGTGAAAGGAAGGAAACCTGCTGCCCTGGGTGAAGCTCAACCAACAAGA
GTTTGGAGGAGAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAATGAATGACAGCTGTTTCC
TAAAGAGACTACTGCAAGAGATAAAAATTTGCTGGAATAAAATCTTGATGGGCACTA
AAGAACACTGA (SEQ ID NO:30)

Фиг. 28

Нуклеиново-кислотная последовательность зрелого человеческогоFcy2(h)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L128S)

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAАСТСАСАСАТGCCCACCGTGCCCAGGTAAG
CCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCT
GCATCCAGGGACAGGCCCCAGCTGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCT
CAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGC
GTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGT
GGGACCCGCGGGGTATGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCTC
TGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAАСТАСАAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACA
CAGAAGAGCGCCACCGCGACCCCGGGTGTGGAGGTGGAGGATCAGGTGGTGGC
GGTGATTGTGATATTGAGGGTAAGGATGGCAAACAGTACGAGAGTGTTCTAATGGT
GAGCATCGACCAGTTATTGGACAGCATGAAGGAGATTGGGAGCAATTGCCTGAATA
ACGAACCCAACTTCTTTAAGAGACACATCTGCGATGCCAATAAGGAAGGGATGTTTT
TAAACCGTGCTGCCCGCAAGTTGAGGCAATTCCTTAAААТGAACAGCACTGGTGAC
TTTGATCTCCACCTGTTAAAAGTTTCAGAAGGCACCACAATCCTGTTGAACTGCACT
GGCCAGGTGAAAGGAAGGAAACCTGCTGCCCTGGGTGAAGCTCAACCAACAAAGA
GTTTGGAGGAGAATAAATCTTTAAGGAACAGAAAAАСТGAATGACAGCTGTTTCC
TAAAGAGACTACTGCAAGAGATAAAAАСТTGTGGAATAAААТCTTGATGGGCACTA
AGAАCACTGA (SEQ ID NO:31)

Фиг. 29

Нуклеиново-кислотная последовательность зрелого huFcy2(h)-
(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L77D и L128S)

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGGTAAG
CCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCT
GCATCCAGGGACAGGCCCCAGCTGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTTCTCT
CAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGT
GGGACCCGCGGGGTATGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCCTC
TGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACA
CAGAAGAGCGCCACCGCGACCCCGGGTGGTGGAGGTGGAGGATCAGGTGGTGGC
GGTGATTGTGATATTGAGGGTAAGGATGGCAAACAGTACGAGAGTGTCTAATGGT
GAGCATCGACCAGTTATTGGACAGCATGAAGGAGATTGGGAGCAATTGCCTGAATA
ACGAACCCAACTTCTTTAAGAGACACATCTGCGATGCCAATAAGGAAGGGATGTTTT
TAAACCGTGCTGCCCGCAAGTTGAGGCAATTCCTTAAAATGAACAGCACTGGTGAC
TTTGATGACCACCTGTAAAAGTTTCAGAAGGCACCACAATCCTGTTGAACTGCACT
GGCCAGGTGAAAGGAAGGAAACCTGCTGCCCTGGGTGAAGCTCAACCAACAAAGA
GTTTGGAGGAGAATAAATCTTTAAGGAACAGAAAAAACTGAATGACAGCTGTTTCC
TAAAGAGACTACTGCAAGAGATAAAAACTTGCTGGAATAAAATCTTGATGGGCACTA
AAGAACACTGA (SEQ ID NO:32)

Фиг. 30

Аминокислотная последовательность зрелого человеческого
Fcy2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSAT
ATPGAGGGGSGGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLLDSMKEIGSNCLNNEPNFFK
RHICDANKEGMFLNRAARKLRQFLKMNSTGDFDHLKLVSEGTTILLNCTGQVKGRKP
AALGEAQPTKSLEENKSLKEQKLNDSFCLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH (SEQ ID
NO:33)

Фиг. 31

Аминокислотная последовательность зрелого человеческого
Fcy2(h)(FN>AQ)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L128S)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSAT
ATPGAGGGGSGGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLLDSMKEIGSNCLNNEPNFFK
RHICDANKEGMFLNRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKLVSEGTTILLNCTGQVKGRKPA
ALGEAQPTKSLEENKSLKEQKLNDSFCLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH (SEQ ID
NO:34)

Фиг. 32

Аминокислотная последовательность зрелого человеческого
Fcy2(h)-(линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L77D, L128S)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSATA
TPGAGGGGSGGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLLDSMKEIGSNCLNNEPNFFKR
HICDANKEGMFLNRAARKLRQFLKMNSTGDFDHLKLVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAA
LGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDSCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH (SEQ ID
NO:35)

Фиг. 33

Аминокислотная последовательность зрелого человеческого
Fcy2(h) (линкер2)-IL-7(F39P, F57N, L128S)

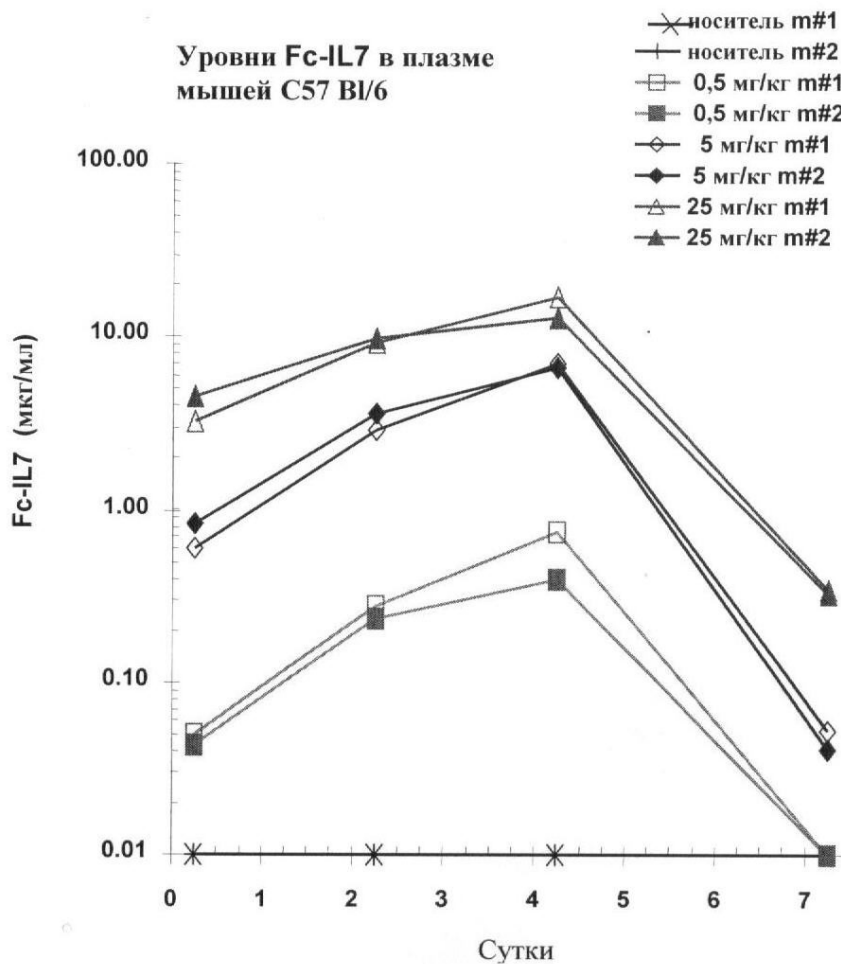
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSATA
TPGAGGGGSGGGGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLLDSMKEIGSNCLNNEPNFFKR
HICDANKEGMFLNRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKLVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAA
LGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDSCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH (SEQ ID
NO:36)

Фиг. 34

Выравнивание последовательностей IL-7 различных млекопитающих (SEQ ID Nos: 37-45)

1	DCDIEGKDGKQYESVLMVSI	DQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDAN	IL-7	Человек
1	-----	MKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDAN	IL-7	Шимпанзе
1	DCDIEGKDGKQYESVLMVSI	DQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHLRDDN	IL-7	Павиан
1	DCDIEGKDGKQYESVLMVSI	DQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHLRDDN	IL-7	Макака
1	DCDISGKDGAYQNVLMVNI	DDL-DNMINFDSNCLNNEPNFFKKHSCDDN	IL-7	Бык
1	DCDIEGKDGGVYQNVLMVSI	DDL-DRMIDFDSNCLNNEPNFLKKHSCDDN	IL-7	Свинья
1	DCDFSGKDGAYQNVLMVSI	DDL-DNMINFDSNCLNNEPNFFKKHSCDDN	IL-7	Овца
1	DCHIKDKDGKAFGSVLMIS	INQL-DKMTGTSDCPNNEPNFFKKHLRDDT	IL-7	Крыса
1	ECHIKDKEGKAYESVLMISI	DEL-DKMTGTSDNCPNNEPNFFKRHVCDT	IL-7	Мышь
51	KEGMFLFRAARKLRQFLKMN	STGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRK	IL-7	Человек
25	KEGMFLFRAARKLRQFLKMN	STGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRK	IL-7	Шимпанзе
51	KEGMFLFRAARKLRQFLKMN	STGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRK	IL-7	Павиан
51	KEGMFLFRAARKLRQFLKMN	STGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRK	IL-7	Макака
50	KEASFLNRAARKLRQFLKMN	ISDDFKLHLSTVSQGTLLNCTSKGKGRK	IL-7	Бык
50	KEASFLYRAARKLRQFLKMN	ISEEFNHHLSTVSQGTLLFNCTSKVKGRK	IL-7	Свинья
50	KEASFLNRAARKLRQFLKMN	ISDDFKLHLSTVSQGTLLNCTSKGKGRK	IL-7	Овца
50	KEAFLNRAARKLRQFLKMN	ISEEFNDHLLRVSDGTQTLVNCTSK-----	IL-7	Крыса
50	KEAFLNRAARKLRQFLKMN	ISEEFNVHLLTVSQGTQTLVNCTSK-----	IL-7	Мышь
101	PAALGEAQPTKSLEENKSLKE	QKKNLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTK	IL-7	Человек
75	PAALGEAQPTKSLEENKSLKE	QKKNLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTK	IL-7	Шимпанзе
101	PAALGEPQPTKSLEENKSLKE	QKKNLNDSCFLKRLLEIKTCWNKILMGTK	IL-7	Павиан
101	PAALGEPQPTKSLEENKSLKE	QKKNLNDSCFLKRLLEIKTCWNKILMGTK	IL-7	Макака
100	PPSLSEAQPTKNLEENKSSKE	QKKNLNDLCFLKILLQKIKTCWNKILRGIK	IL-7	Бык
100	PPSLGEAQLTKNLEENKSLKE	QKRQDLCFLKILLQKIKTCWNKILRGAK	IL-7	Свинья
100	PPSLGEAQPTKNLEENKSLKE	QKKNLNDLCFLKILLQKIKTCWNKILRGIT	IL-7	Овца
95	-----	EEKTIKEQKK-NDPCFLKRLLEIKTCWNKILKGS	IL-7	Крыса
95	-----	EEKNVKEQKK-NDACFLKRLLEIKTCWNKILKGS	IL-7	Мышь
151	EH		IL-7	Человек
125	EH		IL-7	Шимпанзе
151	EH		IL-7	Павиан
151	EH		IL-7	Макака
150	EH		IL-7	Бык
150	EY		IL-7	Свинья
150	EH		IL-7	Овца
129			IL-7	Крыса
129			IL-7	Мышь

Фиг. 35



Фиг. 36

Средняя кратность изменения концентрации в плазме

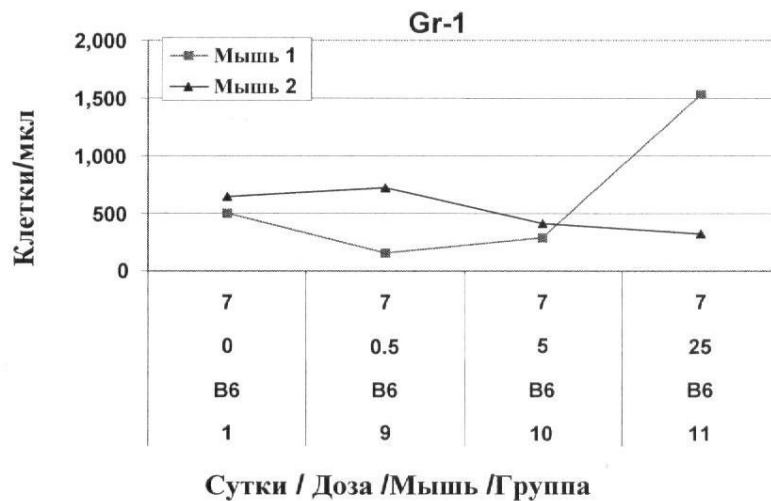
	Сутки 2/Сутки 0		Сутки 4 / Сутки 2	
		sd		sd
0,5 мг/кг SC qdx5	5.5	0.0	2.2	0.5
5 мг/кг SC qdx5	4.5	0.3	2.1	0.3
25 мг/кг SC qdx5	2.5	0.3	1.6	0.3
Среднее всех доз:	4.2	1.2	2.0	0.3

Фиг. 37

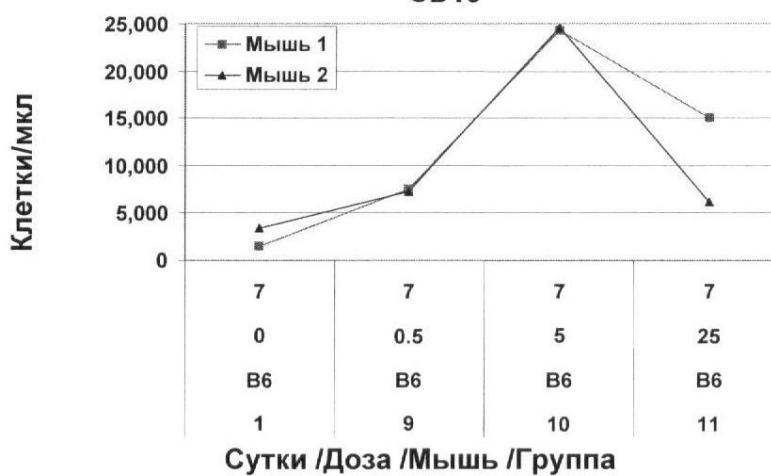
Средние массы органов (г) на сутки 7

	Легкое	+/- sd	Селезенка	+/- sd	Почка	+/- sd	Печень	+/- sd	Тимус	+/- sd
Носитель	0,175	0,075	0,137	0,024	0,192	0,033	1,323	0,110	0,093	0,003
hu Fc g2h (N->Q)-L2-hu IL7(PNDS) 10 мкг, сутки 0-4	0,201	0,004	0,462	0,059	0,190	0,009	1,354	0,186	0,141	0,024
hu Fc g2h (N->Q)-L2-hu IL7(PNDS) 100 мкг, сутки 0-4	0,352	0,045	0,661	0,054	0,168	0,044	1,098	0,350	0,102	0,053
hu Fc g2h (N->Q)-L2-hu IL7(PNDS) 500 мкг, сутки 0-4	0,387	0,014	0,681	0,053	0,151	0,014	1,460	0,063	0,121	0,011

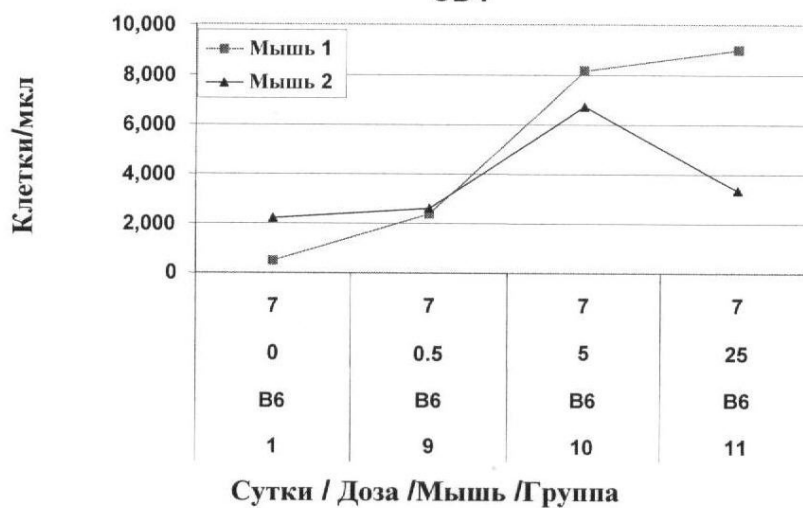
Фиг. 38



Фиг. 39
CD19

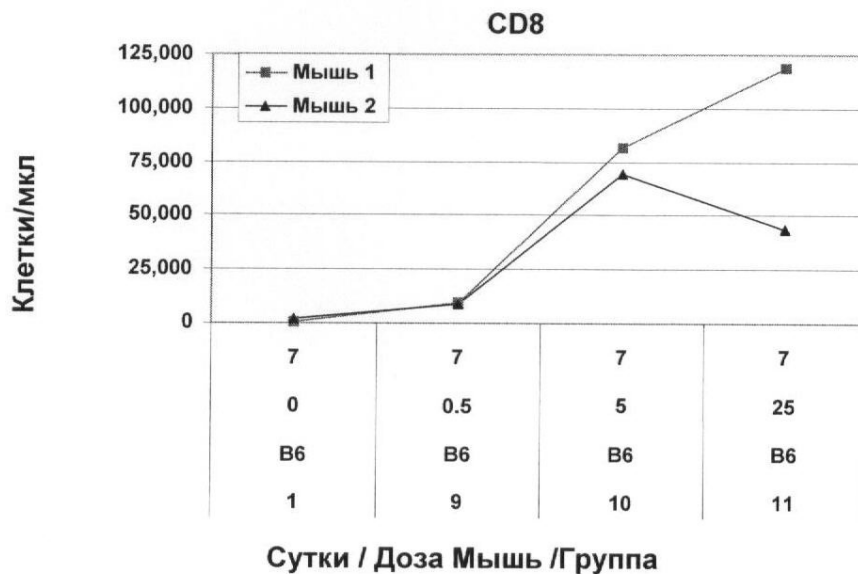


Фиг. 40
CD4

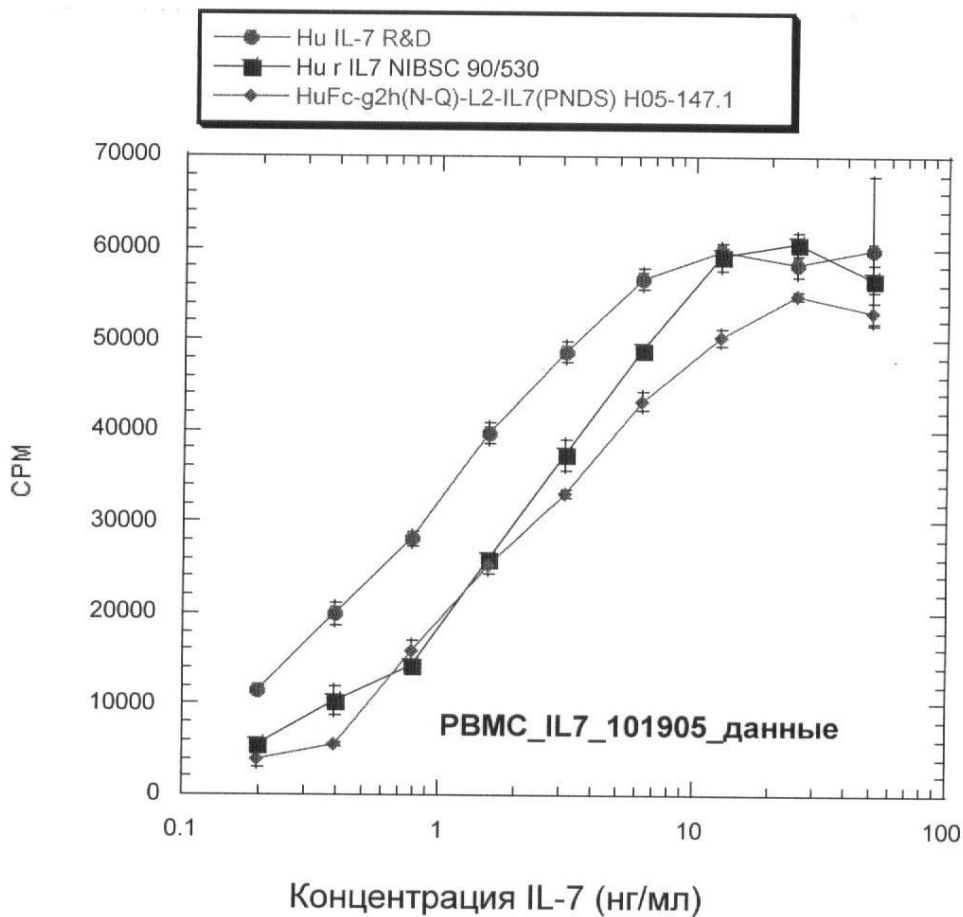


Фиг. 41

Частота клеток CD8+ в периферической крови испытуемых мышей



Фиг. 42



Фиг. 43