



(51) МПК
C07K 14/525 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/191 (2021.08); *A61K 38/2013* (2021.08); *A61K 47/6813* (2021.08); *A61K 47/6843* (2021.08); *A61K 47/6851* (2021.08); *A61P 35/00* (2021.08); *C07K 14/525* (2021.08); *C07K 14/55* (2021.08); *C07K 16/18* (2021.08); *C07K 2317/622* (2021.08); *C07K 2317/626* (2021.08); *C07K 2317/73* (2021.08); *C07K 2319/33* (2021.08); *C07K 2319/74* (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2019117750, 08.11.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.11.2017Дата регистрации:
26.10.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
09.11.2016 GB 1618888.0;
11.08.2017 GB 1712916.4

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2020 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 26.10.2021 Бюл. № 30

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 10.06.2019(86) Заявка РСТ:
EP 2017/078652 (08.11.2017)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2018/087172 (17.05.2018)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

НЕРИ, Дарио (CH),
ДЕ ЛУКА, Роберто (CH),
ВУЛЬХФАРД, Сара (CH)(73) Патентообладатель(и):
ФИЛОДЖЕН С.П.А. (IT)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: PRETTO F. ET AL., Preclinical
evaluation of IL2-based immunocytokines
supports their use in combination with
dacarbazine, paclitaxel and TNF-based
immunotherapy, CANCER IMMUNOLOGY,
IMMUNOTHERAPY, 2014, v. 63, n. 9, p. 901 -
910; WO 2013045125 A1, 04.04.2013; HALIN C.
ET AL., Synergistic therapeutic effects of a tumor
targeting antibody fragment, (см. прод.)**(54) ИММУНОКОНЪЮГАТЫ IL2 И МУТАНТНОГО TNF**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к конъюгатам, содержащим интерлейкин 2 (IL2), мутант фактора некроза опухоли альфа (TNFальфа) и молекулу антитела, которая связывает фибронектин, и может быть использовано в медицине для лечения

злокачественной опухоли. Изобретение обеспечивает улучшение переносимости двойного иммуноцитокина без изменения эффективности за счет применения мутанта TNFальфа со сниженной активностью. 5 н. и 10 з.п. ф-лы, 5 ил., 1 табл., 4 пр.

R U 2 7 5 8 1 3 9 C 2

R U 2 7 5 8 1 3 9 C 2

(56) (продолжение):

fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor alpha, CANCER RESEARCH, 2003, v. 63, n. 12, p.3202 - 3210; RU 2363707 С2,10.08.2009; OSTADE X VAN ET AL., Localization of the active site of human tumour necrosis factor (hTNF) by mutational analysis, EMBO JOURNAL, 1991, v. 10, n. 4, p.827 - 836; ШИНГАРОВА Л.Н. и др., МУТАНТЫ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА: ПОЛУЧЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА, БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 1996, Т. 22, Н. 4, с.243-251; KONTERMANN R. E. et al., Bispecific antibodies, Drug Discovery Today, 2015, V. 7, N. 20, p.838-847; WO 2005087797 A1, 22.09.2005; TOKURIKI N. ET AL., Stability effects of mutations and protein evolvability, Curr. Opin. Struct. Biol., 2009, v.19, n.5, p.596-604; RUDIKOFF S. et al., Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity, Proc Natl Acad Sci USA, 1982, v.79, n.6, p. 1979-1983; FRANKEL A.E. et al., Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor, Protein Eng., 2000, v.13, n.8, p.575-581; ARNAU J. et al., Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins, Protein expression and purification, 2006, V. 48, N. 1, p.1-13; CHEN X. et al., Fusion protein linkers: property, design and functionality, Advanced drug delivery reviews, 2013, v. 65, n. 10, p.1357-1369; MAEDA Y. et al., Engineering of functional chimeric protein G-Vargula Luciferase, Analytical biochemistry, 1997, v. 249, n. 2, p.147-152.

R U
C 2
9 8 1 3 9
2 7 5 8 1 3 9



(19) RU (11) 2 758 139⁽¹³⁾ C2
(51) Int. Cl.
C07K 14/525 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 38/191 (2021.08); *A61K 38/2013* (2021.08); *A61K 47/6813* (2021.08); *A61K 47/6843* (2021.08); *A61K 47/6851* (2021.08); *A61P 35/00* (2021.08); *C07K 14/525* (2021.08); *C07K 14/55* (2021.08); *C07K 16/18* (2021.08); *C07K 2317/622* (2021.08); *C07K 2317/626* (2021.08); *C07K 2317/73* (2021.08); *C07K 2319/33* (2021.08); *C07K 2319/74* (2021.08)

(21)(22) Application: 2019117750, 08.11.2017

(24) Effective date for property rights:
08.11.2017

Registration date:
26.10.2021

Priority:

(30) Convention priority:
09.11.2016 GB 1618888.0;
11.08.2017 GB 1712916.4

(43) Application published: 10.12.2020 Bull. № 34

(45) Date of publication: 26.10.2021 Bull. № 30

(85) Commencement of national phase: 10.06.2019

(86) PCT application:
EP 2017/078652 (08.11.2017)

(87) PCT publication:
WO 2018/087172 (17.05.2018)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

NERI, Dario (CH),
DE LUCA, Roberto (CH),
WULHFARD, Sarah (CH)

(73) Proprietor(s):

PHILOGEN S.P.A. (IT)

(54) IL2 AND MUTANT TNF IMMUNOCONJUGATES

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, specifically to conjugates containing interleukin 2 (IL2), mutant of tumor necrosis factor alpha (hereinafter – TNF-alpha) and an antibody molecule that binds fibronectin; it can be used in

medicine for the treatment of malignant tumor.

EFFECT: invention provides an improvement in the tolerability of double immune-cytokine without changing the efficiency due to the use of TNF-alpha mutant with reduced activity.

15 cl, 5 dwg, 1 tbl, 4 ex

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к конъюгатам, содержащим интерлейкин 2 (IL2), мутантную форму фактора некроза опухоли, такого как фактор некроза опухоли альфа (TNF α) и молекулу антитела. Молекула антитела предпочтительно связывается с 5 антигеном, ассоциированным с неопластическим ростом опухоли и/или ангиогенезом, таким как экстрадомен А (EDA) и экстрадомен В (EDB) фибронектина. Конъюгаты можно использовать, например, для лечения злокачественной опухоли.

Уровень техники

Многие цитокины продемонстрировали высокую противоопухолевую активность

10 в доклинических экспериментах, и они являются перспективными средствами для терапии злокачественной опухоли. Однако, несмотря на обнадеживающие результаты в моделях на животных, только несколько цитокинов, таких как пролейкин 1 (IL2), роферон А1 (интерферон альфа-2a [IFN α 2a]), инtron А1 (IFN α 2b), беромун 1 15 (рекомбинантный TNF α) были одобрены в качестве лекарственных средств против злокачественной опухоли. В настоящее время показания для цитокинов включают метастазирующий почечно-клеточный рак, злокачественную меланому, волосатоклеточный лейкоз, хроническую миелоидную лимфому, саркому и множественную миелому. Цитокины можно вводить либо отдельно, либо в комбинации с химиотерапией.

20 Следующей проблемой провоспалительных цитокинов является, в частности, то, что их применению в терапии часто препятствует значительная токсичность даже в низких дозах, которая препятствует повышению терапевтически активных доз (Hemmerle et al. (2013) Br. J. Cancer 109, 1206-1213).

В попытках увеличить терапевтический индекс определенных цитокинов, были 25 предложены слитые белки антитело-цитокин (также обозначаемые как "иммуноцитокины"). В этих конъюгатах антитело служит в качестве "носителя" для селективного накопления в области заболевания, в то время как цитокиновый груз ответственен за терапевтическую активность (Pasche & Neri, 2012, Drug Discov. Today, 17, 583). Определенные иммуноцитокины на основе провоспалительных грузов (таких 30 как IL2, IL4, IL12 и TNF α) демонстрируют выраженную противоопухолевую активность в моделях на мышах (Hess et al., 2014, Med. Chem. Comm., 5, 408) и дали обнадеживающие результаты у пациентов как с солидными опухолями, так и с гематологическими злокачественными опухолями (Eigenthaler et al., 2011, Clin. Cancer Res. 17, 7732-7742; Papadia et al., 2013, J. Surg. Oncol. 107, 173-179; Gutbrodt et al., 2013, Sci. Transl. Med. 5, 201-204; 35 Weide et al., 2014, Cancer Immunol. Res. 2, 668-678; Danielli et al., 2015, Cancer Immunol. Immunother. 64, 113-121]. Антитело F8 (специфичное к альтернативно-сплайсированному домену EDA фибронектина, маркеру опухолевого ангиогенеза; Rybak et al. (2007) Cancer Res. 67, 10948-10957) используют для нацеливания на опухоль, как отдельно, так и слитым либо с TNF, либо с IL2 (Villa et al. (2008) Int. J. Cancer 122, 2405-2413; Hemmerle et al. (2013) Br. J. Cancer 109, 1206-1213; Frey et al. (2008) J. Urol. 184, 2540-2548).

Описаны конструкции, которые содержат три копии одного модифицированного цитокина суперсемейства TNF, который имеет сниженную активность в отношении его рецептора (WO2015/007903). Конструкции специфически доставляют к клеткам-мишеням посредством нацеливающей части. Модифицированные цитокины, используемые в этих 45 конструкциях, включают мутантный TNF с активностью в диапазоне от 0,02% до 5% от активности TNF дикого типа, включая мутантные TNF с заменами Y87Q, I97S, Y115A, Y87F, Y115G или I97A. Также описан эффект R32G.

В некоторых случаях иммуноцитокины могут опосредовать устранение опухоли в

моделях злокачественной опухоли на мышах при использовании в качестве единственных средств [Gutbrodt et al., 2013, Sci. Transl. Med. 5, 201-204]. Однако в большинстве случаев один продукт-иммуноцитокин не способен индуцировать полное устранение опухоли. Однако излечение злокачественной опухоли описано для

5 комбинаций иммуноцитокинов с цитотоксическими средствами [Moschetta et al., 2012, Cancer Res. 72, 1814-1824], интактными антителами [Schliemann et al., 2009, Blood, 113, 2275-2283] и облучением внешним пучком [Zegers et al., 2015, Clin. Cancer Res., 21, 1151-1160].

Кроме того, несколько комбинаций иммуноцитокинов используются в терапии.

10 Например, конъюгаты L19-IL2 и L19-TNF α были способны излечить нейробластому в модели заболевания на полностью сингенных мышах, в то время отдельные иммуноцитокины, используемые в качестве единственных средств, не приводили к устраниению заболевания [Balza et al., 2010, Int. J. Cancer, 127, 101]. Комбинация грузов IL2 и TNF α также продемонстрировала перспективные результаты в клинических 15 испытаниях. Было показано, что слитые белки L19-IL2 и L19-TNF обладают высокой синергичностью при внутриочаговом лечении определенных солидных опухолей у мышей [Schwager et al., 2013, J. Invest. Dermatol. 133, 751-758]. Соответствующие полностью человеческие слитые белки вводят внутрь очага повреждения пациентам с меланомой стадии III-C [Danielli et al., 2015, Cancer Immunol. Immunother. 64, 113-121], и 20 они демонстрируют лучшие результаты по сравнению с внутриочаговым введением интерлейкина-2 [Weide et al., 2011, Cancer - 116, 4139-4146] или L19-IL2 [Weide et al., 2014, Cancer Immunol. Immunother. 2, 668-678]. Однако генетическое слияние цитокина с антителом не всегда приводит к увеличенной эффективности. Например, слияние интерлейкина-17 с антителом для нацеливания не снижало рост опухоли [Pasche et al., 25 2012, Angiogenesis 15, 165-169].

Также были предприняты попытки получить "двойные иммуноцитокины", в которых антитело является генетически слитым с двумя различными цитокинами. Например, интерлейкин-12 (IL12) и TNF α были включены в одну молекулярную структуру. Однако эти попытки не были успешными и не привели к программам клинических разработок.

30 В частности, описана тройная слитая конструкция, состоящая из: (i) антитела L19 в формате scFv (специфичного к альтернативно-сплайсированному домену EDB фибронектина, маркеру опухолевого ангиогенеза); (ii) TNF α мыши; и (iii) IL12 мыши в одноцепочечном формате [Halin et al., 2003, Cancer Res., 63, 3202-3210]. Этот слитый белок смогли экспрессировать и очистить до однородного состояния. Этот слитый 35 белок также связывался со своим антигеном с высокой аффинностью и специфичностью, однако (в отличие от L19-TNF α и L19-IL12), он не локализовался в солидных опухолях *in vivo*, о чем свидетельствовали исследования количественного биораспределения у мышей, имеющих опухоль. Таким образом, поведение двойных иммуноцитокинов *in vivo* является чрезвычайно непредсказуемым.

40 Также описаны бифункциональные слитые белки цитокинов, в которых цитокины связаны с интактным целым антителом (или Fc-частью антитела) [Gillies et al., 2002, Cancer Immunol. Immunother. 51, 449]. Эти слитые белки содержали интерлейкин-2/интерлейкин-12 (IL2/IL12) или интерлейкин-4/гранулолитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (IL4/GM-CSF). Активность цитокинов была сохранена 45 в конструкциях, в которых цитокины были слиты tandemно с C-концом Fc или тяжелой (H) цепи антитела, а также в конструкциях, в которых один цитокин был слит с C-концом H-цепи, в то время как второй цитокин был слит с N-концом вариабельной области либо H, либо легкой (L) цепи. Связывание антигена слитыми белками антитело-цитокин

сохранялось. Однако терапевтическая активность *in vivo* описана только для применений в генной терапии (т.е. опухолевые клетки, трансфицированные соответствующими иммуноцитокинами IL2/IL12), но не для терапевтических белков. Бифункциональные слитые белки цитокинов, содержащие другие типы нацеливающих частей, не описаны.

5 Имманентная сложность успешной экспрессии иммуноконъюгатов, содержащих два различных цитокина в одной молекуле (также называемых "двойными иммуноцитокинами") и бесперспективные результаты, полученные для таких молекул, как описано выше (например, в Halin et al (2003)), означают, что к этим молекулярным форматам отсутствует интерес в отношении клинических применений.

10 Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения установили, что применение мутанта фактора некроза опухоли (TNF) со сниженной активностью улучшает переносимость двойного иммуноцитокина, который содержит TNF и IL2, а также нацеливающую молекулу антитела, без изменения эффективности.

15 Один из аспектов настоящего изобретения относится к конъюгату, содержащему интерлейкин-2 (IL2), мутант TNF, имеющий сниженную активность, и молекулу антитела, которая связывает антиген, ассоциированный с неопластическим ростом и/или ангиогенезом.

Другой аспект изобретения относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей 20 такой конъюгат, а также к экспрессирующему вектору, содержащему такую нуклеиновую кислоту. Также предусматривается клетка-хозяин, содержащая такой вектор.

Другой аспект изобретения относится к конъюгату, описанному в настоящем описании, для применения в способе лечения злокачественной опухоли путем 25 нацеливания IL2 и мутанта TNF, предпочтительно мутанта TNF α , на новообразованные сосуды *in vivo*, а также к конъюгату, описанному в настоящем описании, для применения в способе доставки IL2 и мутанта TNF, предпочтительно мутанта TNF α , в новообразованные сосуды опухоли у пациента.

Другой аспект изобретения относится к способу лечения злокачественной опухоли 30 путем нацеливания IL2 и мутанта TNF, предпочтительно мутанта TNF α , на новообразованные сосуды у пациента, причем способ включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем описании, пациенту, а также к способу доставки IL2 и мутанта TNF, предпочтительно мутанта TNF α , в новообразованные сосуды опухоли у пациента, включающему введение пациенту 35 конъюгата, описанного в настоящем описании.

Кроме того, другой аспект изобретения относится к применению конъюгата, описанного в настоящем описании, для получения лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли. Аналогично предусматривается применение конъюгата, описанного в настоящем описании, для получения лекарственного средства для доставки 40 IL2 и мутанта TNF, предпочтительно мутанта TNF α , в новообразованные сосуды опухоли.

Краткое описание чертежей

На фиг.1 представлена активность уничтожения клеток конъюгатом huIL2-F8-huTNF α и конъюгатом huIL2-F8-мутант huTNF α (R32A). Протестированные конъюгаты 45 представляли собой huIL2-F8-huTNF α и huIL2-F8-huTNF α (R32A), которые содержали мутантный TNF α в положении 32, IL2 и антитело F8 против ED-A. Активность уничтожения клеток этим мутантным конъюгатом сравнивали с активностью уничтожения клеток, наблюдаемой в присутствии конъюгата huIL2-F8-huTNF α .

Активность уничтожения клеток конъюгатом huIL2-F8-мутант huTNF α (R32A) была более низкой, чем у конъюгата huIL2-F8-huTNF α , как можно видеть из величин EC50. Величины EC50 представляют собой концентрацию лекарственного средства, требуемую для полумаксимальной активности.

На фиг.2 представлена эффективность нацеливания *in vivo* конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R32A), оцененная посредством анализа биораспределения. Конъюгат huIL2-F8-мутант huTNF α (R32A) селективно накапливался в опухоли в модели тератокарциномы F9 на мышах.

На фиг.3 представлен анализ биологической активности IL2 конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32A) на основе пролиферации клеток CTLL-2.

На фиг.4 представлен анализ биологической активности TNF конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32A) на основе уничтожения клеток HT1080.

На фиг.5 представлен количественный анализ биораспределения меченого радиоактивным йодом конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32A) у иммунокомпетентных мышей, имеющих опухоли тератокарциномы F9.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к конъюгату, содержащему (i) часть, являющуюся интерлейкином-2 (IL2), (ii) часть, которая представляет собой мутант фактора некроза опухоли (TNF), имеющий сниженную активность, и (iii) молекулу антитела, которая связывает антиген, ассоциированный с неопластическим ростом и/или ангиогенезом.

Термин "молекула антитела" описывает иммуноглобулин, как природный, так и частично или полностью синтетический. Также термин относится к любому полипептиду или белку, содержащему антигенсвязывающий центр антитела. Молекулы антител можно выделять или получать путем очистки из природных источников, или в ином случае их можно получать посредством генетической рекомбинации или химического синтеза, и они могут содержать неприродные аминокислоты.

Антитела могут быть модифицированы рядом способов, термин "молекула антитела" следует считать охватывающим какой-либо конкретный связывающий представитель или вещество, имеющие антигенсвязывающий центр антитела с требуемой специфичностью и/или связыванием с антигеном. Таким образом, этот термин охватывает фрагменты антитела, в частности, антигенсвязывающие фрагменты, и производные, включая любой полипептид, содержащий антигенсвязывающий центр антитела, как природный, так и полностью или частично синтетический. Таким образом, он включает химерные молекулы, содержащие антигенсвязывающий центр антитела или эквивалент, слитый с другим полипептидом (например, принадлежащим к другому классу или подклассу антител). Клонирование и экспрессия химерных антител описаны в EP-A-0120694 и EP-A-0125023, и в большом количестве более поздней литературы.

Как упоминалось выше, фрагменты целого антитела могут выполнять функцию связывания антигенов. Примерами связывающих фрагментов являются (i) Fab-фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iii) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного антитела; (iv) dAb-фрагмент (Ward et al. (1989) Nature 341, 544-546; McCafferty et al., (1990) Nature, 348, 552-554; Holt et al. (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490), который состоит из домена VH или VL; (v) выделенные области CDR; (vi) F(ab')2-фрагмент - двухвалентный фрагмент, содержащий два связанных Fab-фрагмента; (vii) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), где домен VH и домен VL связаны пептидным линкером, который позволяет связывание двух доменов с образованием антигенсвязывающего центра (Bird et al. (1988) Science, 242, 423-426; Huston et al. (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883); (viii) биспецифические

одноцепочечные димеры Fv (PCT/US92/09965); (ix) "диантитела" - поливалентные или мультиспецифические фрагменты, сконструированные посредством слияния генов (WO94/13804; Holliger et al. (1993a), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448) и (x) формат одноцепочечных диантител, где каждый из доменов VH и VL в наборе соединен коротким или "негибким" пептидным линкером. Fv, scFv или молекулы диантител можно стабилизировать путем включения дисульфидных мостиков, связывающих домены VH и VL (Reiter et al. (1996), Nature Biotech, 14, 1239-1245). Одноцепочечный Fv (scFv) может находиться в миниммуноглобулине или малом иммунопротеине (SIP), например, как описано в (Li et al., (1997), Protein Engineering, 10: 731-736). SIP может содержать молекулу scFv, сплитую с доменом CH4 секреторной изоформы IgE человека IgE-S2 (ϵ_{S2} -CH4; Batista et al., (1996), J. Exp. Med., 184: 2197-205), образующим гомодимерную молекулу миниммуноглобулина. Также можно получать миниантитела, содержащие scFv, связанный с CH3-доменом (Hu et al. (1996), Cancer Res., 56(13):3055-61). Другими примерами связывающихся фрагментов являются Fab', который отличается от Fab-фрагментов присоединением нескольких остатков на C-конце CH1-домена тяжелой цепи, включая один или несколько остатков цистеина из шарнирной области антитела, и Fab'-SH, который представляет собой Fab'-фрагмент, в котором остаток(и) цистеина константных доменов содержат свободную тиольную группу.

Время полужизни молекул антител для применения в конъюгатах, описанных в настоящем описании, может быть увеличено посредством химической модификации, особенно посредством пегилирования, или путем включения в липосому.

Подходящие молекулы антител для применения в конъюгатах, описанных в настоящем описании, включают диантитела или более предпочтительно scFv. Диантитела и scFv не содержат Fc-область антитела, что потенциально снижает эффекты антидиотипической реакции. Предпочтительно, молекула антитела для применения в конъюгатах, описанных в настоящем описании, представляет собой scFv.

Когда молекула антитела представляет собой scFv, домены VH и VL антитела предпочтительно связаны линкером из 10-20 аминокислот, линкером из 14-20 аминокислот, предпочтительно линкером из 10-14 аминокислот. Подходящие линкеры известны в данной области и доступны квалифицированному специалисту. Например, линкер может иметь последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 51.

Когда молекула антитела представляет собой диантитело, домены VH и VL могут быть связаны линкером из 5-12 аминокислот. Диантитело содержит две молекулы VH-VL, которые связаны с образованием димера. Домены VH и VL каждой молекулы VH-VL могут быть связаны линкером из 5-12 аминокислот.

Авторы настоящего изобретения показали, что конъюгат, содержащий IL2; мутантный TNFa и молекулу антитела, которая связывает экстрадомен A (ED-A) фибронектина, демонстрирует сниженную токсичность по сравнению с конъюгатом, содержащим IL2; TNFa и молекулу антитела, которая связывает экстрадомен A (ED-A) фибронектина. Более того, авторы настоящего изобретения также показали, что конъюгат, содержащий IL2; мутантный TNFa и молекулу антитела, которая связывает изоформу экстрадомена B (ED-B) фибронектина, демонстрирует сниженную токсичность по сравнению с рекомбинантным TNFa. Другие конъюгаты, содержащие IL2 и мутантный TNF, предпочтительно TNFa, и молекулу антитела, которая связывает антиген, ассоциированный с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, имеют аналогичным образом сниженную токсичность.

Токсичность конъюгата, содержащего мутантный TNF, как описано в настоящем

описании, может быть снижена по сравнению с соответствующим конъюгатом, содержащим TNF дикого типа. Сниженная токсичность может обеспечивать улучшенную переносимость у пациента, например, снижение одного или нескольких неблагоприятных симптомов, ассоциированных с введением конъюгата(ов) пациенту. Неблагоприятные

5 симптомы, уменьшающиеся в результате уменьшения токсичности, могут включать снижение массы тела, тошноту, рвоту, лихорадку, озноб, приливы, крапивницу, сыпь, легочную токсичность, диспноэ, гипотензию, анафилаксию, сывороточную болезнь, повышенный уровень креатинина, головную боль.

Более того, снижение токсичности мутанта TNF в конъюгате повышает синергический
10 эффект части, представляющей собой IL2, которую можно вводить в более высокой дозе вследствие более низкой активности мутантного TNF. Таким образом, цитокины с подобранной эффективностью в конъюгате могут быть пригодными в терапевтических применениях.

Авторы настоящего изобретения также показали, что конъюгат, содержащий IL2 и
15 мутантный TNFa, и молекулу антитела, которая связывает экстрадомен А (ED-A) фибронектина, может успешно нацеливаться на новообразованные сосуды опухоли *in vivo*. Более того, авторы настоящего изобретения также показали, что конъюгат, содержащий IL2 и мутант TNFa, и молекулу антитела, которая связывает экстрадомен В (ED-B) фибронектина, может успешно нацеливаться на новообразованные сосуды
20 опухоли *in vivo*. Другие конъюгаты, содержащие IL2 и мутантный TNF, предпочтительно TNFa, и молекулу антитела, которая связывает антиген, ассоциированный с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, аналогично могут быть пригодными для нацеливания IL2 и мутантного TNF на новообразованные сосуды опухоли и, таким образом, применимы для лечения злокачественной опухоли. Также показано, что
25 конъюгат, содержащий IL2; TNFa и молекулу антитела, которая связывает экстрадомен А (ED-A) фибронектина, нацелен на новообразованные сосуды опухоли *in vivo* (PCT/EP2016/060128).

Многие антигены, ассоциированные с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, известны в данной области в качестве антител, способных связывать такие антигены.
30 Кроме того, антитела против данного антитела можно получать с использованием хорошо известных способов, таких как способы, описанные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления антиген может представлять собой компонент внеклеточного матрикса, ассоциированный с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, такой как фибронектины, включая изоформу экстрадомена А (ED-A)
35 фибронектина (A-FN), изоформу экстрадомена В (ED-B) фибронектина (B-FN), тенасцин С, ED-A фибронектина, ED-B фибронектина или домен A1 тенасцина С. Антитела, которые связывают ED-A фибронектина, и таким образом, также A-FN, известны в данной области и включают антитело F8. Антитела, которые связывают ED-B фибронектина, или домен A1 тенасцина С (и, таким образом, также B-FN и тенасцин
40 С), также известны в данной области и включают антитела L19 и F16, соответственно. Было показано, что антитела, которые связывают ED-B фибронектина, или домен A1 тенасцина С, включая антитела L19 и F16, способны к специальному нацеливанию на новообразованные сосуды опухоли *in vivo*. Таким образом, конъюгат, описанный в настоящем описании, содержащий IL2, мутант TNF, предпочтительно TNFa, и молекулу
45 антитела, которая связывает антиген, ассоциированный с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, предпочтительно демонстрирует сниженную токсичность при введении пациенту по сравнению с введением конъюгата, содержащего IL2, TNF и молекулу антитела, пациенту.

Другие антигены, которые ассоциированы с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, включают карбоангидразу IX (маркер почечноклеточного рака), A33 и СЕА (надежные маркеры рака ободочной и прямой кишки), HER2 (маркер рака молочной железы), PSMA (маркер рака предстательной железы) и белок активации фибробластов (протеаза, присутствующая как в качестве мембранных белка, так и в качестве отделенного белка, на активированных фибробластах и определенных типах опухолевых клеток). Конъюгаты, содержащие IL2 и мутант TNF, предпочтительно TNF α , и молекулу антитела, которая связывает антигены, такие как карбоангидраза IX, A33, СЕА, HER2, PSMA или белок активации фибробластов, аналогичным образом являются пригодными для нацеливания IL2 и TNF на новообразованные сосуды опухоли и, таким образом, применимы для лечения злокачественной опухоли и будут демонстрировать сниженную токсичность.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления молекула антитела для применения, как описано в настоящем описании, может иметь CDR и/или домены VH и/или VL антител F8, L19 или F16, описанных в настоящем описании. Молекула антитела для применения, как описано в настоящем описании, предпочтительно имеет CDR антитела F8, указанные в SEQ ID NO: 6-11. Более предпочтительно, антитело для применения, как описано в настоящем описании, может содержать домены VH и/или VL антитела F8, указанные в SEQ ID NO: 2 и 4. Еще более предпочтительно, антитело для применения, как описано в настоящем описании, содержит домены VH и VL антитела F8, указанные в SEQ ID NO: 2 и 4. Антитело F8 предпочтительно имеет формат scFv или диантитела, наиболее предпочтительно формат scFv. Когда антитело F8 имеет формат scFv, молекула антитела для применения, как описано в настоящем описании, предпочтительно имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5.

Другая молекула антитела для применения, как описано в настоящем описании, предпочтительно имеет CDR антитела L19, указанные в SEQ ID NO: 18-23. Более предпочтительно, антитело для применения, как описано в настоящем описании, может содержать домены VH и/или VL антитела L19, указанные в SEQ ID NO: 24 и 25. Еще более предпочтительно, антитело для применения, как описано в настоящем описании, содержит домены VH и VL антитела L19, указанные в SEQ ID NO: 24 и 25. Антитело L19 предпочтительно имеет формат scFv или диантитела, наиболее предпочтительно формат scFv. Когда антитело L19 имеет формат scFv, молекула антитела для применения, как описано в настоящем описании, предпочтительно имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26.

Молекула антитела для применения, как описано в настоящем описании, может связывать A-FN и/или ED-A фибронектина с той же аффинностью, что и антитело F8 против ED-A, например, в формате scFv, или с лучшей аффинностью. Молекула антитела для применения, как описано в настоящем описании, может связывать B-FN и/или ED-B фибронектина с той же аффинностью, что и антитело L19 против ED-B, например, в формате scFv, или с лучшей аффинностью. Молекула антитела для применения, как описано в настоящем описании, может связывать тенасцин C и/или домен A1 тенасцина C с той же аффинностью, что и у антитела F16 против тенасцина C, например, в формате scFv, или с лучшей аффинностью.

Молекула антитела для применения, как описано в настоящем описании, может связываться с тем же эпитопом на A-FN и/или ED-A фибронектина, что и у антитела F8 против ED-A. Молекула антитела по настоящему изобретению может связываться с тем же эпитопом на B-FN и/или ED-B фибронектина, что и у антитела L19 против ED-

В. Молекула антитела молекула по настоящему изобретению может связываться с тем же эпитопом на тенасцине С и/или домене А1 тенасцина С, что и у антитела F16.

В рамках настоящего изобретения можно получать и использовать варианты молекул антител, описанных в настоящем описании. Способы, требуемые для проведения замен

- 5 в аминокислотных последовательностях CDR, доменах VH или VL антитела, в частности, каркасных областях доменов VH и VL, и молекулах антител, обычно доступны в данной области. Последовательности вариантов можно получать с заменами, для которых может быть предсказано или может не быть предсказано наличие минимального или благоприятного эффекта на активность, и тестировать в отношении способности
- 10 связывать А-FN и/или ED-A фибронектина, В-FN и/или ED-B фибронектина, тенасцин С и/или домен А1 тенасцина С, и/или в отношении любого другого требуемого свойства.

Предусматривается, что от 1 до 5, например, от 1 до 4, в том числе от 1 до 3, или 1 или 2, или 3 или 4, аминокислотных изменений (вставка, делеция, замена и/или инсерция аминокислотного остатка) может быть внесено в одну или несколько CDR и/или домены

- 15 VH и/или VL молекулы антитела, как описано в настоящем описании. Таким образом, молекула антитела, которая связывает FN-A, FN-B или тенасцин С, может содержать CDR и/или домен VH и/или VL антитела F8, L19 или F16, описанного в настоящем описании, с 5 или менее, например, 5, 4, 3, 2 или 1 изменением аминокислот в CDR и/или домене VH и/или VL. Например, молекула антитела, которая связывает FN-A, FN-B или
- 20 тенасцин С, может содержать домен VH и/или VL антитела F8, L19 или F16, описанного в настоящем описании, с 5 или менее, например, 5, 4, 3, 2 или 1 изменением аминокислот в каркасной области домена VH и/или VL. Таким образом, молекула антитела, которая связывает FN-A или ED-A фибронектина, упоминаемая в настоящем описании, может содержать домен VH, представленный в SEQ ID NO: 2, и/или домен VL, представленный
- 25 в SEQ ID NO: 4, с 5 или менее, например, 5, 4, 3, 2 или 1 изменением аминокислот в каркасной области домена VH и/или VL. Такая молекула антитела может связывать ED-A-изоформу или ED-A фибронектина с той же или по существу той же аффинностью, что и у молекулы антитела, содержащей домен VH, представленный в SEQ ID NO: 2, и домен VL, представленный в SEQ ID NO: 4, или может связывать ED-A-изоформу или
- 30 ED-A фибронектина с более высокой аффинностью, чем у молекулы антитела, содержащей домен VH, представленный в SEQ ID NO: 2, и домен VL, представленный в SEQ ID NO: 4. Таким образом, молекула антитела, которая связывает FN-B или ED-B фибронектина, упоминаемая в настоящем описании, может содержать домен VH, представленный в SEQ ID NO: 24, и/или домен VL, представленный в SEQ ID NO: 25, с
- 35 5 или менее, например, с 5, 4, 3, 2 или 1 изменением аминокислоты в каркасной области домена VH и/или VL. Такая молекула антитела может связывать изоформу ED-B или ED-B фибронектина с такой же или по существу такой же аффинностью, что и у молекулы антитела, содержащей домен VH, представленный в SEQ ID NO: 24, и домен VL, представленный в SEQ ID NO: 25, или может связывать ED-B-изоформу или ED-B
- 40 фибронектина с более высокой аффинностью, чем у молекулы антитела, содержащей домен VH, представленный в SEQ ID NO: 24, и домен VL, представленный в SEQ ID NO: 25.

Молекула антитела для применения, как описано в настоящем описании, может содержать домен VH и/или VL, который обладает по меньшей мере 70%, более

- 45 предпочтительно любой из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичностью последовательности с доменом VH и/или VL, в зависимости от ситуации, антитела F8, L19 или F16, указанного в SEQ ID NO: 2, 4, 24, 25, 33 и 34. Молекула антитела для применения, как описано в настоящем описании,

может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью антител F8, L19 или F16, указанных в SEQ ID NO: 5, 26, 35 и 46, соответственно.

- 5 Антигенсвязывающий центр является частью молекулы, которая распознает и связывает весь антиген-мишень или его часть. В молекуле антитела его называют антигенсвязывающим центром антитела или пептитопом, и он содержит часть антитела, которая распознает и связывает весь антиген-мишень или его часть. Когда антиген является большим, антитело может связываться только с конкретной частью антигена,
- 10 которую называют эпитетопом. Антигенсвязывающий центр антитела может быть предоставлен посредством одного или нескольких вариабельных доменов антитела. Предпочтительно антигенсвязывающий центр содержит вариабельную область легкой цепи (VL) антитела и вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела.

Антигенсвязывающий центр может быть предоставлен посредством компоновки определяющих комплементарность областей (CDR). Структурой, содержащей CDR или набор CDR, как правило, является последовательность тяжелой или легкой цепи антитела или значительная ее часть, в которой CDR или набор CDR расположен в области, соответствующей CDR или набору CDR встречающихся в природе вариабельных доменов VH и VL антитела, кодируемыми реарранжированными генами

- 15 имmunоглобулинов. Структуры и положение вариабельных доменов immunоглобулинов могут быть определены в соответствии с Kabat et al. (1987) (*Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4th Edition. US Department of Health and Human Services.*) и ее переизданиями, в настоящее время доступной через Интернет (на immuno.bme.nwu.edu или при поиске "Kabat" с использованием любого поискового инструмента).

- 20 Под областью CDR, или CDR, подразумевают гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей имmunоглобулина в соответствии с определением Kabat et al. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Edition, US Department of Health and Human Services (Kabat et al., (1991a), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington и последующие издания).* Антитело, как правило, содержит 3 CDR тяжелой цепи и 3 CDR легкой цепи. Термин "CDR" или "несколько CDR" может указывать, в зависимости от ситуации, на одну из этих областей, или несколько или даже все, из этих областей, которые содержат большинство аминокислотных остатков, ответственных за аффинное
- 25 антитела с антигеном или эпитетопом, который оно распознает.

Среди шести коротких последовательностей CDR третья CDR тяжелой цепи (HCDR3) имеет более высокую вариабельность размера (большее разнообразие, в основном вследствие механизмов организации генов, которая его обеспечивает). Ее длина может составлять только 2 аминокислоты, хотя наибольший известный размер составляет 26.

- 30 Функционально, HCDR3 участвует в определении специфичности антитела (Segal et al., (1974), PNAS, 71:4298-4302; Amit et al., (1986), Science, 233:747-753; Chothia et al., (1987), J. Mol. Biol., 196:901-917; Chothia et al., (1989), Nature, 342:877-883; Caton et al., (1990), J. Immunol., 144:1965-1968; Sharon et al., (1990a), PNAS, 87:4814-4817; Sharon et al., (1990b), J. Immunol., 144:4863-4869; Kabat et al., (1991b), J. Immunol., 147:1709-1719).
- 35 Антигенсвязывающий центр молекулы антитела для применения, как описано в настоящем описании, предпочтительно имеет CDR антитела F8, указанные в SEQ ID NO: 6-11, CDR антитела L19, указанные в SEQ ID NO: 18-23, или CDR антитела F16, указанные в SEQ ID NO: 27-32. Наиболее предпочтительно, антигенсвязывающий центр

молекулы антитела для применения, как описано в настоящем описании, имеет CDR антитела F8, указанные в SEQ ID NO: 6-11, или CDR антитела L19, указанные в SEQ ID NO: 18-23.

В данной области доступны различные способы получения молекул антител против

⁵ антигена-мишени. Молекулы антител для применения в конъюгатах, описанных в настоящем описании, предпочтительно представляют собой моноклональные антитела, особенно человека, мыши, химерные или гуманизированные, которые могут быть получены стандартными способами, хорошо известными специалисту в данной области. Наиболее предпочтительно, молекула антитела для применения в конъюгатах,

¹⁰ описанных в настоящем описании, представляет собой молекулу антитела человека.

Является возможным использование моноклональных и других антител и технологии рекомбинантных ДНК для получения других антител или химерных молекул, которые связывают антиген-мишень. Такие способы могут вовлекать встраивание ДНК, кодирующую вариабельную область иммуноглобулина или CDR молекулы антитела,

¹⁵ в константные области, или константные области плюс каркасные области, другого иммуноглобулина (см., например, EP-A-184187, GB 2188638A или EP-A-239400, и большое количество последующих источников литературы). Гибридому или другую клетку, производящую антитело, также можно подвергать генетической мутации или другим изменениям, которые могут изменять или могут не изменять специфичность

²⁰ производимых антител.

Доступные в данной области способы инженерии антител позволили выделить антитела человека и гуманизированные антитела. Например, гибридомы человека можно получать, как описано в Kontermann & Dubel (2001), S, Antibody Engineering, Springer-Verlag New York, LLC; ISBN: 3540413545. Фаговый дисплей - другой

²⁵ общезвестный способ получения специфических связывающих представителей - подробно описан во многих публикациях, таких как WO92/01047 (дополнительно рассмотрена ниже) и патенты США US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447,

³⁰ US6291650, US6492160, US6521404 и Kontermann & Dubel (2001), S, Antibody Engineering, Springer-Verlag New York, LLC; ISBN: 3540413545. Для выделения антител человека можно использовать трансгенных мышей, у которых гены антител мыши инактивированы и функционально заменены генами антител человека, в то время как остальные компоненты иммунной системы мыши остаются интактными (Mendez et al., (1997), Nature Genet, 15(2): 146-156).

³⁵ Как правило, для получения моноклональных антител или их функциональных фрагментов, особенно из мыши, можно использовать способы, которые описаны, в частности, в руководстве "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988), или способ получения из гибридом, описанный Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495-497.

⁴⁰ Моноклональные антитела можно получать, например, из клетки животного, иммунизированного против антигена, ассоциированного с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, такого как A-FN, B-FN, тенасцин C, ED-A фибронектина, ED-B фибронектина или домен A1 тенасцина C, в соответствии с обычными способами, посредством генетической рекомбинации, начинающейся с последовательности

⁴⁵ нуклеиновой кислоты, содержащейся в последовательности кДНК, кодирующей A-FN, B-FN или тенасцин C, или их фрагмент, или посредством пептидного синтеза, начинающегося с последовательности аминокислот, содержащейся в пептидной последовательности A-FN, B-FN или тенасцина C, и/или их фрагмента.

Синтетические молекулы антител можно получать посредством экспрессии с генов, полученных синтезом олигонуклеотидов и сборки их в подходящие экспрессирующие векторы, например, как описано Knappik et al. (2000) J. Mol. Biol. 296, 57-86 или Krebs et al. (2001) Journal of Immunological Methods, 254 67-84.

- 5 Альтернативно, одну или несколько молекул антител против антигена, ассоциированного с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, такого как A-FN, ED-A, B-FN, ED-B, тенасцин С или домен A1 тенасцина С, можно получать путем приведения в контакт библиотеки молекул антител и антигена или его фрагмента, например, фрагмента, содержащего или состоящего из ED-A, ED-B или домена A1
- 10 тенасцина С, или их пептидного фрагмента, и отбора одной или нескольких молекул из библиотеки, способных связываться с антигеном.

Библиотеку антител можно подвергать скринингу с использованием итеративного скрининга колоний на фильтре (ICFS). При ICFS бактерии, содержащие ДНК, кодирующую несколько специфичностей связывания, выращивают в жидкой среде и

- 15 после достижения стадии экспоненциального роста несколько миллиардов их распределяют на подложку для роста, состоящую из подходящим образом предварительно обработанного мембранных фильтра, который инкубируют до тех пор, пока не появляются полностью смыкающиеся колонии бактерий. Вторая подложка-ловушка состоит из другого мембранных фильтра, предварительно увлажненного и
- 20 покрытого требуемым антигеном.

Затем мембранны-ловушку помещают на чашку, содержащую подходящую культуральную среду, и накрывают фильтром для роста вверх поверхностью, покрытой бактериальными колониями. Полученный таким образом "сэндвич" инкубируют при комнатной температуре в течение приблизительно 16 ч. Таким образом, является

- 25 возможной достижене экспрессии генов, кодирующих фрагменты антител, такие как scFv, обладающие распространяющимся действием, так чтобы эти фрагменты, специфически связывающиеся с антигеном, который присутствует на мемbrane-ловушке, улавливались. Затем мембранны-ловушку можно обрабатывать для идентификации связанных фрагментов антител, таких как scFv, например, с использованием
- 30 колориметрических способов, обычно используемых для этой цели.

Положение идентифицированных фрагментов, например, в качестве окрашенных пятен, на фильтре-ловушке, позволяет вернуться к соответствующим бактериальным колониям, которые присутствуют на мемbrane для роста и продуцируют уловленные фрагменты антител. Колонии собирают и выращивают, и бактерии распределяют на новую культуральную мембрану, повторяя методики, описанные выше. Затем проводят аналогичные циклы до тех пор, пока положительные сигналы на мемbrane-ловушке не будут соответствовать единичным положительным колониям, каждая из которых соответствует потенциальному источнику фрагментов моноклональных антител, направленных против антигена, используемого в селекции. ICFS описан, например, в

- 35 WO02/46455.
- 40

Библиотеку также можно экспонировать на частицах или молекулярных комплексах, например, реплицирующихся генетических упаковках, таких как частицы бактериофага (например, T7), или других системах дисплея *in vitro*, причем каждая частица или молекулярный комплекс содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный

- 45 домен VH антитела, экспонированный на нем, и необязательно также экспонированный домен VL при его наличии. Фаговый дисплей описан в WO92/01047 и, например, в патентах США US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 и

US6521404.

После селекции молекул антител, способных связывать антиген и экспонироваться на бактериофаге или других частицах библиотеки или молекулярных комплексах, нуклеиновая кислота может быть извлечена из бактериофага или другой частицы или 5 молекулярного комплекса, экспонирующих указанную отобранную молекулу антитела. Такую нуклеиновую кислоту можно использовать для последующей продукции молекулы антитела или вариабельного домена VH или VL антитела посредством экспрессии с нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность нуклеиновой кислоты, взятую из бактериофага или другой частицы или молекулярного комплекса, 10 экспонирующих указанную отобранную молекулу антитела.

Способность связывать антиген, ассоциированный с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, такой как A-FN, B-FN, ED-A или ED-B фибронектина, тенасцин С или домен А1 тенасцина С или другой антиген-мишень или изоформа, можно далее 15 тестировать, например, в отношении способности конкурировать с антителом, специфичным к A-FN, B-FN, ED-A или ED-B фибронектина, тенасцину С или домену А1 тенасцина С, таким как антитело F8, L19 или F16.

Новые области VH или VL, содержащие происходящие из CDR последовательности для применения, как описано в настоящем описании, также можно получать с использованием случайного мутагенеза одного или нескольких отобранных генов VH 20 и/или VL для получения мутаций по всему вариабельному домену. В некоторых вариантах осуществления одну или две аминокислотные замены вносят в целый вариабельный домен или набор CDR. Другим способом, который можно использовать, является прямой мутагенез областей CDR генов VH или VL.

Вариабельные домены, используемые, как описано в настоящем описании, можно 25 получать или извлекать из любого вариабельного домена эмбрионального типа или реаранжированного вариабельного домена человека, или они могут представлять собой синтетический вариабельный домен на основе консенсусных или фактических последовательностей известных вариабельных доменов человека. Вариабельный домен может происходить из не являющегося человеческим антитела. Последовательность 30 CDR для применения, как описано в настоящем описании (например, CDR3), можно встраивать в репертуар вариабельных доменов, лишенных CDR (например, CDR3), с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Например, в Marks et al. (1992) описаны способы получения репертуаров вариабельных доменов антител, в которых консенсусные праймеры, направленные на 5'-конец или вблизи него области 35 вариабельного домена, используют совместно с консенсусными праймерами к третьей каркасной области генов VH человека с получением репертуара вариабельных доменов VH, лишенных CDR3. Кроме того, в Marks et al. описано, как этот репертуар можно комбинировать с CDR3 конкретного антитела. С использованием аналогичных способов 40 происходящие из CDR3 последовательности по настоящему изобретению можно подвергать шаффлингу с репертуарами доменов VH или VL, лишенных CDR3, и полученные путем шаффлинга полные домены VH или VL комбинировать с совместимыми доменами VL или VH с получением молекул антител для применения, как описано в настоящем описании. Затем репертуар можно экспонировать в подходящей системе-хозяине, такой как система фагового дисплея WO92/01047, или 45 любого из последующих источников литературы, включая Kay, Winter & McCafferty (1996), так что можно отбирать подходящие молекулы антител. Репертуар может состоять из любого числа из 10^4 индивидуальных представителей и выше, например по меньшей мере 10^5 , по меньшей мере 10^6 , по меньшей мере 10^7 , по меньшей мере 10^8 , по

меньшей мере 10^9 или по меньшей мере 10^{10} представителей.

Антиген, ассоциированный с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, такой как A-FN, B-FN, ED-A или ED-B фибронектина, тенасцин С или домен A1 тенасцина С, можно использовать в скрининге молекул антител, например, молекул антител для применения, как описано в настоящем описании. Скрининг может представлять собой скрининг репертуара, как описано в настоящем описании.

Аналогично, одну или несколько, или все три CDR можно пересаживать в репертуар доменов VH или VL, которые затем подвергают скринингу в отношении молекулы антитела или молекул антител в отношении антигена, ассоциированного с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, такого как A-FN, B-FN, ED-A или ED-B фибронектина, тенасцин С или домен A1 тенасцина С. Можно использовать одну или несколько из HCDR1, HCDR2 и HCDR3 антител F8, L19 или F16, или набор HCDR антител F8, L19 или F16, и/или можно использовать одну или несколько из LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антител F8, L19 или F16, или набор LCDR антител F8, L19, или F16.

Значительная часть вариабельного домена иммуноглобулина может содержать по меньшей мере три области CDR вместе с встроенными в них каркасными областями. Эта часть также может включать по меньшей мере приблизительно 50% любой или обеих из первой и четвертой каркасных областей, причем 50% представляют собой С-концевые 50% первой каркасной области и N-концевые 50% четвертой каркасной области. Дополнительные остатки на N-конце или С-конце значительной части вариабельного домена могут представлять собой остатки, которые в норме не ассоциированы со встречающимися в природе областями вариабельных доменов. Например, конструкция молекул антител по настоящему изобретению, полученных способами рекомбинантных ДНК, может обеспечивать внесение N- или С-концевых остатков, кодируемыми линкерами, внесенными для облегчения клонирования или других стадий манипулирования. Другие стадии манипулирования включают внесение линкеров для связывания вариабельных доменов, описанных в настоящем описании, с другими белковыми последовательностями, включая константные области антител, другие вариабельные домены (например, при получении диантител) или поддающиеся обнаружению/функциональные метки, как более подробно описано в настоящем описании.

Хотя молекулы антител могут содержать пару доменов VH и VL, также можно использовать единичные связывающие домены на основе последовательностей либо домена VH, либо домена VL, как описано в настоящем описании. Известно, что единичные домены иммуноглобулинов, особенно домены VH, способны связывать антигены-мишени специфическим образом. Например, см. обсуждение dAb выше.

В случае любого из единичных связывающих доменов, эти домены можно использовать для скрининга комплементарных доменов, способных образовывать двухдоменную молекулу антитела, способную связывать антиген, ассоциированный с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, такой как A-FN, B-FN, ED-A или ED-B фибронектина, тенасцин С или домен A1 тенасцина С. Этого можно достигать способами скрининга посредством фагового дисплея с использованием так называемого иерархического двойного комбинаторного подхода, как описано в WO92/01047, в котором индивидуальную колонию, содержащую либо Н-цепь, либо L-цепь, используют для инфицирования полной библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или Н), и полученную двухцепочечную молекулу антитела подвергают селекции в соответствии со способами фагового дисплея, такими как способы, описанные в указанной ссылке. Этот способ также описан в Marks 1992.

Фрагменты целых антител для применения, как описано в настоящем описании, можно получать, начиная с любых из молекул антител, описанных в настоящем описании, например, молекул антител, содержащих домены VH и/или VL или CDR любых антител, описанных в настоящем описании, способами, такими как расщепление 5 ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или расщепление дисульфидных связей посредством химического восстановления. Иным образом, фрагменты антител можно получать способами генетической рекомбинации, аналогично известными специалисту в данной области, или также посредством пептидного синтеза с использованием, 10 например, автоматизированных устройств для синтеза пептидов, таких как устройства, предоставляемые компанией Applied Biosystems, и т.д., или посредством синтеза и экспрессии нуклеиновых кислот.

Конъюгат, как описано в настоящем описании, содержит IL2 и мутантный TNF, предпочтительно TNFa, и молекулу антитела, которая связывает антиген, ассоциированный с неопластическим ростом и/илиangiогенезом, как описано в 15 настоящем описании. Предпочтительно молекула антитела представляет собой scFv или диантитело, наиболее предпочтительно scFv, как описано в настоящем описании.

Предпочтительно IL2 представляет собой IL2 человека.

Предпочтительно IL2 содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 12. Как правило, IL2 обладает по меньшей мере 70%, более предпочтительно 20 одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 12. IL2 в конъюгатах по изобретению сохраняет биологическую активность IL2 человека, например, способность ингибировать пролиферацию клеток.

Предпочтительно TNF предпочтительно представляет собой TNF человека. Когда 25 фактор некроза опухоли представляет собой TNFa, TNFa предпочтительно представляет собой TNFa человека.

Мутантный TNF в конъюгатах, описанных в настоящем описании, представляет собой мутант TNF, который сохраняет биологическую функцию TNF человека, например, способность ингибировать клеточную пролиферацию, но сохраняет сниженную 30 активность.

Мутант TNF может содержать одну или несколько мутаций, которые снижают активность относительно TNF дикого типа, который лишен одной или нескольких мутаций, т.е. мутантный TNF является менее эффективным, чем TNF дикого типа. Например, мутант TNF может содержать мутацию в положении, соответствующем 35 положению 32 в SEQ ID NO: 15 или положению 52 в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления R в указанном положении может быть замещен другой аминокислотой, предпочтительно аминокислотой, отличной от G, например, неполярной аминокислотой, предпочтительно A, F или V, наиболее предпочтительно A.

Последовательности примеров подходящих мутантных TNF указаны в SEQ ID NO: 37, 40 39, 54-55, 56-57, соответственно.

В настоящем описании показано, что тип остатка в положении мутантного TNF, соответствующем положению 32 в SEQ ID NO: 15 или положению 52 в SEQ ID NO: 17, влияет на выход белка при экспрессии рекомбинантной системы. Например, присутствие W в этом положении приводит по существу к отсутствию экспрессии в рекомбинантной 45 системе и присутствие A в этом положении приводит к неожиданно высоким выходам в рекомбинантной системе.

TNFa человека состоит из цитоплазматического домена из 35 аминокислот, трансмембранный домена из 20 аминокислот и внеклеточного домена из 177

аминокислот. Внеклеточный домен из 177 аминокислот расщепляется с образованием растворимой формы из 157 аминокислот, которая является биологически активной и которая образует нековалентно связанный тример в растворе. В контексте настоящего изобретения TNF α человека представляет собой мутант TNF α , который предпочтительно 5 представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α человека или внеклеточный домен TNF α человека. Последовательность растворимой формы внеклеточного домена TNF α человека представлена в SEQ ID NO: 15. Как правило, мутантный TNF α обладает по меньшей мере 70%, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, 10 по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%, идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 15, с одной или несколькими мутациями, которые снижают активность, например, мутацией в 15 положении, соответствующем расположению 32 в SEQ ID NO: 15. Последовательность внеклеточного домена TNF α человека представлена в SEQ ID NO: 17. В этом случае мутантный TNF α может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно одной из по меньшей мере по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью 20 последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 17, с одной или несколькими мутациями, которые снижают активность, например, мутацией в положении, соответствующем расположению 52 в SEQ ID NO: 17.

Авторы изобретения показали, что коньюгат по настоящему изобретению, и в частности, TNF α , присутствующий в коньюгате по настоящему изобретению, где остаток 25 аргинина TNF α в положении 32 SEQ ID NO: 15 или в положении 52 SEQ ID NO: 17 замещен аланином, демонстрирует сниженную активность. Таким образом, мутантный TNF α может содержать или состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15 или 17, за исключением того, что остаток в положении 32 SEQ ID NO: 15 или в положении 52 SEQ ID NO: 17 представляет собой остаток аланина, а не остаток аргинина. 30 Эта последовательность представлена в SEQ ID NO: 37 или 39. Таким образом, мутантный TNF α предпочтительно содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 37. Как правило, мутантный TNF α обладает по меньшей мере 70%, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичностью последовательности с аминокислотной 35 последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 37, с А в положении, соответствующем расположению 32 в SEQ ID NO: 37. Таким образом, альтернативно TNF α может содержать или состоять из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 39. В этом случае TNF α может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичностью 40 последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 39, с А в положении, соответствующем расположению 52 в SEQ ID NO: 39.

Наиболее предпочтительно, IL2 содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, и/или TNF α содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 37.

Мутантные белки TNF α можно тестировать в анализах *in vivo* и *in vitro*. Подходящие 45 анализы включают, но не ограничиваются ими, анализы активности и анализы связывания. Замена или делеция остатка аргинина в положении 32 (Arg 32) описана в документах уровня техники. Например, была предложена замена остатка аргинина на серин, глутамин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гистидин,

триптофан, треонин или тирозин (US 7101974; US 5422104; WO1988/006625; Yamagishi et al., Protein Eng. (1990) 3:713-9)). Более того, также была предложена делеция Arg32 в EP158286. Мутанты, в которых Arg 32 заменен триптофаном, продемонстрировали утрату цитотоксической активности (Van Ostade et al. The Embo Journal (1991) 10:827-836).

- 5 Мутанты, где аргинин в положении 29, и/или 31, и/или 32 заменен на триптофан или тирозин, продемонстрировали значительное отличие аффинности связывания между рецептором p75 TNF человека и рецептором p55-TNF человека (US 5422104). В US 7101974 описаны варианты TNF α , которые взаимодействуют с TNF α дикого типа с образованием смешанных тримеров, неспособных активировать передачу сигнала
- 10 рецептором. В этом последнем примере Arg32 заменен на аспаргиновую кислоту, глутаминовую кислоту или гистидин.

Предпочтительно, молекула антитела связана с мутантом IL2 и TNF, предпочтительно мутантом TNF α , через линкеры, например, пептидные линкеры. Альтернативно молекула антитела и IL2 и/или мутантный фактор некроза опухоли могут быть соединены прямо, 15 например, через химическую связь. Когда молекула антитела связана с IL2 и мутантом фактора некроза опухоли посредством одного или нескольких пептидных линкеров, конъюгат может представлять собой слитый белок. Под "слитым белком" подразумеваются полипептид, который представляет собой продукт трансляции в результате слияния двух или более генов или кодирующих последовательностей 20 нуклеиновых кислот в одну открытую рамку считывания (ORF).

Химическая связь может представлять собой, например, ковалентную или ионную связь. Примеры ковалентных связей включают пептидные связи (амидные связи) и дисульфидные связи. Молекула антитела и мутант IL2 и/или TNF, предпочтительно мутант TNF α , могут быть ковалентно связаны, например, пептидными связями (амидные 25 связи). Таким образом, молекула антитела, в частности, scFv-часть молекулы антитела, и IL2 и/или мутант TNF, предпочтительно мутант TNF α , могут быть получены в качестве слитого белка.

Когда молекула антитела представляет собой двухцепочечную или мультицепочечную молекулу (например, диантитело), IL2 и/или мутант TNF могут быть конъюгированы 30 в качестве слитого белка с одной или несколькими полипептидными цепями в молекуле антитела.

Пептидный линкер, соединяющий молекулу антитела и IL2 и/или мутант TNF, может представлять собой гибкий пептидный линкер. Подходящие примеры последовательностей пептидных линкеров известны в данной области. Линкер может 35 иметь длину 10-20 аминокислот, предпочтительно 10-15 аминокислот. Наиболее предпочтительно, линкер имеет длину 11-15 аминокислот. Линкер может иметь последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 49. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления IL2 и мутант TNF могут быть связаны с молекулой антитела линкерами, указанными в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 40 14, соответственно. В других предпочтительных вариантах осуществления IL2 и мутант TNF могут быть связаны с молекулой антитела линкерами, указанными в SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 14, соответственно.

Например, в конъюгатах, проиллюстрированных в примере 2, IL2 конъюгирован с доменом VH scFv F8 и TNF α или мутант TNF α конъюгирован с доменом VL scFv F8, 45 каждый через пептидный линкер, как показано в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 36, соответственно. В конъюгате, проиллюстрированном в примере 4, IL2 конъюгирован с доменом VH scFv L19 и TNF α или мутант TNF α конъюгирован с доменом VL scFv L19, каждый через пептидный линкер, как показано в SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 44,

соответственно.

Однако ожидается, что конъюгат, содержащий IL2 и мутант TNF, предпочтительно мутант TNF α , и молекулу антитела, которая связывает антиген, ассоциированный с неопластическим ростом и/илиangiогенезом, может продемонстрировать такие же или сходные свойства нацеливания на опухоль, и/или терапевтическую эффективность, что и фактор некроза опухоли и IL2, конъюгированные с молекулой антитела. Таким образом, когда молекула антитела представляет собой или содержит scFv, IL2 может быть связан с N-концом домена VH scFv через пептидный линкер и мутантный TNF может быть связан с C-концом домена VL scFv через пептидный линкер. Альтернативно, когда молекула антитела представляет собой или содержит scFv, мутантный TNF может быть связан с N-концом домена VH scFv через пептидный линкер и IL2 может быть связан с C-концом домена VL scFv через пептидный линкер. Ожидается, что конъюгат может иметь такие же или сходные свойства нацеливания на опухоль, и/или терапевтическую эффективность, и/или активность уничтожения клеток, как если бы как IL2, так и мутантный TNF, предпочтительно TNF α , были конъюгированы с доменом VH антитела. В качестве следующей альтернативы, IL2 и мутантный TNF, предпочтительно мутантный TNF α , могут, таким образом, быть связаны с C-концом домена VL антитела, например, в формате scFv, через пептидный линкер. В качестве еще одной альтернативы, IL2 и мутантный TNF, предпочтительно мутантный TNF α , могут быть связаны с N-концом домена VH антитела, например, в формате scFv, через пептидный линкер. В последних двух конъюгатах, IL2 и TNF могут быть расположены в любом порядке и/или необязательно могут быть связаны друг с другом через пептидный линкер. Подходящие пептидные линкеры описаны в настоящем описании.

Конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из

последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36, или могут представлять собой ее вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью, например, аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36. Предпочтительно, остаток в положении варианта, соответствующем положению 432 SEQ ID NO: 36 представляет собой A. Например, конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 36, может содержать остаток A в положении 432.

Альтернативно конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, с мутацией R на A в положении 432 или SEQ ID NO: 16 с мутацией R на A в положении 452, или они могут представлять собой варианты одной из этих последовательностей. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью, например, аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 16. Предпочтительно, остаток в положении, соответствующем положению 432 в варианте SEQ ID NO: 1 is A и остаток в положении, соответствующем положению 452 в варианте SEQ ID NO: 16, представляет собой A. Например, конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 16, может содержать остаток A в положении 432 или 452 соответственно.

Альтернативно конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38, или могут представлять собой ее вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%,
 5 по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью, например, аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 38. Предпочтительно, остаток в положении варианта, соответствующем положению 452 SEQ ID NO: 38, представляет собой А. Например,
 10 конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 38, может содержать остаток А в положении 452.

Альтернативно конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 58-63, или могут представлять собой ее вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%,
 15 более предпочтительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью, например, одной из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 58-63.

20 Предпочтительно, остаток в положении, соответствующем положению 432 в варианте SEQ ID NO: 58, 60 или 62, представляет собой W, F или V, соответственно.

Предпочтительно, остаток в положении, соответствующем положению 452 в варианте SEQ ID NO: 59, 61 или 63, представляет собой W, F или V, соответственно.

Альтернативно конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или

25 состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 40, или могут представлять собой ее вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 40.

Предпочтительно, остаток в положении варианта, соответствующем положению 427 SEQ ID NO: 40, представляет собой А. Например, конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 40, может содержать остаток А в положении 427.

Альтернативно конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или

35 состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 41, или могут представлять собой ее вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичностью последовательности с эталонной последовательностью, например, аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 41.

40 Предпочтительно, остаток в положении варианта, соответствующем положению 447 SEQ ID NO: 41, представляет собой А. Например, конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 41, может содержать остаток А в положении 447.

Альтернативно конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42, или могут

45 представлять собой ее вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 42. Предпочтительно, остаток в положении варианта,

соответствующем положению 428 SEQ ID NO: 42, представляет собой А. Например, коньюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 42, может содержать остаток А в положении 428.

Альтернативно коньюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или

- 5 состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43, или могут представлять собой ее вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 43. Предпочтительно, остаток в положении варианта,
- 10 соответствующем положению 448 SEQ ID NO: 43, представляет собой А. Например, коньюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 43, может содержать остаток А в положении 448.

Альтернативно коньюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 44, или могут

- 15 представлять собой ее вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 44. Предпочтительно, остаток в положении варианта, соответствующем положению 430 SEQ ID NO: 44, представляет собой А. Например,
- 20 коньюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 44, может содержать остаток А в положении 430.

Альтернативно коньюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45, или могут

- 25 представлять собой ее вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 45. Предпочтительно, остаток в положении варианта, соответствующем положению 450 SEQ ID NO: 45, представляет собой А. Например,
- 30 коньюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 45, может содержать остаток А в положении 450.

Альтернативно коньюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 70 с мутацией R на A в положении 430 или SEQ ID NO: 71 с мутацией R на A в положении 450, или могут представлять собой вариант одной из этих последовательностей. Вариант может

- 35 обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью, например, аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 70
- 40 или SEQ ID NO: 71. Предпочтительно, остаток в положении, соответствующем положению 430 в варианте SEQ ID NO: 70, представляет собой А и остаток в положении, соответствующем положению 450 в варианте SEQ ID NO: 71, представляет собой А. Например, коньюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71, может содержать остаток А в положении 430 или 450 соответственно.

- 45 Альтернативно коньюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 64-69, или могут представлять собой их вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%

или 99%, идентичностью последовательности с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 64-69. Предпочтительно, остаток в положении, соответствующем положению 430 в варианте SEQ ID NO: 64, 66 или 68 представляет собой W, F или V, соответственно. Предпочтительно, остаток в положении, 5 соответствующем положению 450 в варианте SEQ ID NO: 65, 67 или 69, представляет собой W, F или V, соответственно.

Альтернативно конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 47, или могут представлять собой ее вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более 10% предпочтительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 47.

Предпочтительно, остаток в положении варианта, соответствующем положению 431 15 SEQ ID NO: 47, представляет собой A. Например, конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 47, может содержать остаток A в положении 431.

Альтернативно конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 48, или могут представлять собой ее вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более 20% предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичностью последовательности с эталонной последовательностью, например, аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 48. Предпочтительно, остаток в положении варианта, соответствующем положению 451 SEQ ID NO: 48, представляет собой A. Например, конъюгат, который представляет 25 собой вариант SEQ ID NO: 48, может содержать остаток A в положении 451.

Альтернативно конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 72-77, или могут представлять собой их вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более 30% предпочтительно одной из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичностью последовательности с эталонной последовательностью, например, аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 72-77. Предпочтительно, остаток в положении, соответствующем положению 431 в варианте SEQ ID NO: 72, 74 или 76, представляет собой W, F или V, соответственно. Предпочтительно, остаток в положении, соответствующем положению 451 в варианте 35 SEQ ID NO: 73, 75 или 77, представляет собой W, F или V, соответственно.

Не ограничиваясь каким-либо теоретическим объяснением, конъюгат, описанный в настоящем описании, содержащий мутантный TNF, может образовывать гомотример в растворе. Такой тримерный конъюгат может содержать три молекулы активного IL2 на одну молекулу активного TNF со сниженной активностью (в тримерной структуре). 40 Это может быть преимущественным, поскольку иммуноцитокины на основе IL2 обычно используют в клинике в более высоких дозах по сравнению с иммуноцитокинами на основе TNF α . Например, было обнаружено, что рекомендованная доза L19-IL2 составляет 4 мг у пациентов со злокачественной опухолью [Johannsen et al. (2010) Eur. J. Cancer], в то время как рекомендованная доза L19-TNF α находится в диапазоне доз 45 1-1,5 мг [Spitaleri et al. (2012) J. Clin. Oncol. Cancer Res.]. Более того, можно использовать более высокие дозы конъюгатов, описанных в настоящем описании, поскольку мутант TNF имеет сниженную активность по сравнению с конъюгатом, содержащим TNF дикого типа и IL2. Таким образом, конъюгаты, описанные в настоящем описании,

могут иметь преимущественные свойства в отношении режимов введения.

Также предусматривается выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая конъюгат, как описано в настоящем описании. Молекулы нуклеиновых кислот могут содержать ДНК и/или РНК и могут быть частично или полностью синтетическими.

⁵ Отсылка к нуклеотидной последовательности, указанной в настоящем описании, охватывает молекулу ДНК с указанной последовательностью и охватывает молекулу РНК с указанной последовательностью, в которой У заменен на Т, если контекст не требует иного.

Кроме того, предусматриваются конструкции в форме плазмид, векторов (например, экспрессионных векторов), кассет транскрипции или экспрессионных кассет, которые содержат такие нуклеиновые кислоты. Могут быть выбраны или сконструированы подходящие векторы, содержащие надлежащие регуляторные последовательности, включая промоторные последовательности, последовательности терминаторов, последовательности полиаденилирования, энхансерные последовательности, маркерные гены и другие последовательности в зависимости от ситуации. Векторы могут представлять собой плазмиды, например фагмиду, или могут быть вирусными, например, фаговыми, в зависимости от ситуации. Для дальнейших деталей см., например, Sambrook & Russell (2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual:3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Многие известные способы и протоколы для манипулирования нуклеиновыми кислотами, например, в препарате конструкций нуклеиновых кислот, мутагенеза, секвенирования, введения ДНК в клетки и экспрессии генов, и анализа белков подробно описаны в Ausubel et al. (1999) 4th eds., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons.

²⁵ Также предусматривается рекомбинантная клетка-хозяин, которая содержит одну или несколько конструкций, как описано выше. Подходящие клетки-хозяева включают бактерии, клетки млекопитающих, клетки растений, нитчатые грибы, дрожжевые и бакуловирусные системы и трансгенные растения и животные.

Конъюгаты, описанные в настоящем описании, можно получать с использованием такой рекомбинантной клетки-хозяина. Способ получения может включать экспрессию нуклеиновой кислоты или конструкции, как описано выше. Экспрессию удобно осуществлять культивированием рекомбинантной клетки-хозяина в условиях, подходящих для продуцирования конъюгата. После продуцирования конъюгат можно выделять и/или очищать с использованием любого подходящего способа, а затем использовать надлежащим образом. Конъюгат может быть составлен в виде композиции, включающей по меньшей мере один дополнительный компонент, такой как фармацевтически приемлемый эксципиент.

³⁰ Системы для клонирования и экспрессии полипептида в множестве различных клеток-хозяев хорошо известны. Экспрессия антител, включая их конъюгаты, в прокариотических клетках является общеизвестной в данной области. Для обзора см., например, Plückthun (1991), Bio/Technology 9: 545-551. Обычным бактериальным хозяином является E.coli.

³⁵ Экспрессия в эукариотических клетках в культуре также доступна специалистам в данной области в качестве возможности продуцирования конъюгатов, например, Chadd et al. (2001), Current Opinion in Biotechnology 12: 188-194; Andersen et al. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 117; Lerrick & Thomas (2001) Current Opinion in Biotechnology 12:411-418. клеточные линии млекопитающих, доступные в данной области для экспрессии гетерологичного полипептида, включают клетки яичника китайского

хомячка (СНО), клетки HeLa, клетки почки детеныша хомячка, клетки миеломы мыши NS0, клетки миеломы крысы YB2/0, клетки почки эмбриона человека, клетки сетчатки эмбриона человека и многие другие.

Также описан способ, включающий введение нуклеиновой кислоты или конструкции, 5 описанной в настоящем описании, в клетку-хозяина. Для введения можно использовать любой доступный способ. Для эукариотических клеток доступные способы могут включать трансфекцию с фосфатом кальция, способ с DEAE-декстраном, электропорацию, опосредованную липосомами трансфекцию и трансдукцию с использованием ретровируса или другого вируса, например, вируса коровьей оспы, 10 или, для клеток насекомых, бакуловируса. Для введения нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, в частности, эукариотическую клетку можно использовать вирусную систему или систему на основе плазмида. Плазмидная система может поддерживаться эпизомно, или может быть встроена в хромосому клетки хозяина или в искусственную хромосому. Включение может осуществляться либо путем случайного, либо путем направленного 15 встраивания одной или нескольких копий в один или несколько локусов. Для бактериальных клеток подходящие способы могут включать трансформацию с хлоридом кальция, электропорацию и трансфекцию с использованием бактериофага.

Нуклеиновая кислота или конструкция может встраиваться в геном (например, 20 хромосому) клетки-хозяина. Встраивание можно обеспечивать включением последовательностей, которые осуществляют рекомбинацию с геномом, в соответствии со стандартными способами.

Термин "выделенный" относится к состоянию, когда конъюгаты, описанные в настоящем описании, антитела для применения, как описано в настоящем описании, или нуклеиновая кислота, кодирующая такие конъюгаты, в основном являются 25 соответствующими настоящему изобретению. Таким образом, конъюгаты, описанные в настоящем описании, антитела для применения, как описано в настоящем описании, или нуклеиновая кислота, кодирующая такие конъюгаты, могут быть предоставлены в выделенной и/или очищенной форме, например, из среды, в которой они получены (такой как культура клеток), в по существу чистой или однородной форме, или, в случае 30 нуклеиновой кислоты, свободными или по существу свободными от нуклеиновых кислот с последовательностью, отличной от последовательности, кодирующей полипептид с требуемой функцией. Выделенные представители и выделенные нуклеиновые кислоты свободны или по существу свободны от материала, с которым они встречаются в среде, в которой они получены (например, клеточной культуре), 35 когда такое получение осуществляется посредством технологии рекомбинантных ДНК, практикуемой *in vitro* или *in vivo*. Конкретные конъюгаты и нуклеиновые кислоты могут быть составлены с разбавителями или адьювантами, и, тем не менее, для практических целей быть выделенными, например, представители могут быть смешаны с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями при использовании в 40 терапии. Конкретные конъюгаты могут быть гликозилированными, либо естественным образом, либо посредством систем гетерологичных эукариотических клеток (например, клетки СНО или NS0 (ECACC 85110503), или они могут быть негликозилированными (например, если получены посредством экспрессии в прокариотической клетке)).

Также можно использовать гетерогенные препараты конъюгатов, как описано в 45 настоящем описании. Например, такие препараты могут представлять собой смеси конъюгатов, содержащих молекулы антител с полноразмерными тяжелыми цепями или тяжелыми цепями, лишенными С-концевого лизина, с различной степенью гликозилирования и/или с дериватизированными аминокислотами, такими как

аминокислоты, образованные в результате циклизации N-концевой глутаминовой кислоты с образованием остатка пироглутаминовой кислоты.

Фибронектин представляет собой антиген, являющийся результатом альтернативного сплайсинга, и известен ряд альтернативных форм фибронектина, включая альтернативно сплайсированные изоформы фибронектина, включая альтернативно сплайсированные изоформы A-FN и B-FN, содержащие домены ED-A или ED-B, соответственно, которые являются известными маркерами ангиогенеза. Молекула антитела, описанная в настоящем описании, может селективно связываться с изоформами фибронектина, селективно экспрессируемыми в новообразованных сосудах. Молекула антитела может связывать изоформу A-FN фибронектина, например, она может связывать домен ED-A (экстрадомен А). Молекула антитела может связывать ED-B (экстрадомен В).

Экстрадомен-А (EDA или ED-A) фибронектина также известен как ED, экстраповтор А типа III (ЕША) или EDI. Последовательность ED-A человека опубликована Kornblihtt et al. (1984), Nucleic Acids Res. 12, 5853-5868 и Paolella et al. (1988), Nucleic Acids Res. 16, 15 3545-3557. Последовательность ED-A человека также доступны в базе данных SwissProt в качестве аминокислот 1631-1720 (фибронектин типа III 12; экстрадомен 2) аминокислотной последовательности, депонированной под номером доступа P02751. Последовательность ED-A мыши доступна в базе данных SwissProt в качестве аминокислот 1721-1810 (фибронектин типа III 13; экстрадомен 2) аминокислотной последовательности, депонированной под номером доступа P11276.

Изоформа ED-A фибронектина (A-FN) содержит экстрадомен-А (ED-A).

Последовательность A-FN человека может быть определена из соответствующей последовательности предшественника фибронектина человека, которая доступна в базе данных SwissProt под номером доступа P02751. Последовательность A-FN мыши может быть определена из соответствующей последовательности предшественника фибронектина мыши, которая доступна в базе данных SwissProt под номером доступа P11276. A-FN может представлять собой изоформу ED-A фибронектина человека. ED-A может представлять собой экстрадомен А фибронектина человека.

ED-A представляет собой последовательность из 90 аминокислот, которая встроена

30 в фибронектин (FN) посредством альтернативного сплайсинга и расположена между доменами 11 и 12 FN (Borsi et al. (1987), J. Cell. Biol., 104, 595-600). ED-A в основном отсутствует в плазматической форме FN, но в большом количестве присутствует в ходе эмбриогенеза, ремоделирования тканей, фиброза, трансплантации сердца и роста солидной опухоли.

35 Изоформа B-FN фибронектина является одним из наиболее известных маркеров ангиогенеза (US 10/382107, WO01/62298). Экстрадомен "ED-B" из 91 аминокислоты встречается в изоформе B-FN и идентичен у мыши, крысы, кролика, собаки и человека. B-FN накапливается вокруг структур новообразованных сосудов в агрессивных опухолях и других тканях, претерпевающих ангиогенез, таких как эндометрий в пролиферативной 40 фазе и некоторые глазные структуры в патологических условиях, но в остальных случаях не поддается обнаружению в нормальных тканях взрослого организма.

Тенасцин-С представляет собой большой гексамерный гликопротеин внеклеточного матрикса, который модулирует адгезию клеток. Он вовлечен в такие процессы, как пролиферация клеток и миграция клеток, и ассоциирован с изменениями архитектуры 45 тканей, происходящими в ходе морфогенеза и эмбриогенеза, а также в процессе образования опухоли или ангиогенеза. В результате альтернативного сплайсинга может образовываться несколько изоформ тенасцина-С, что может приводить к включению (множества) доменов в центральной части этого белка, в диапазоне от домена A1 до

домена D (Borsi L et al Int J Cancer 1992; 52:688-692, Carnemolla B et al. Eur J Biochem 1992; 205:561-567, WO2006/050834). Молекула антитела, описанная в настоящем описании, может связывать тенасцин-С. Молекула антитела может связывать домен А1 тенасцина-С.

5 Злокачественная опухоль, упоминаемая в настоящем описании, может представлять собой злокачественную опухоль, которая экспрессирует или для которой показана экспрессия антигена, ассоциированного с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, такого как компонент внеклеточного матрикса, ассоциированный с неопластическим ростом и/или ангиогенезом.

10 Предпочтительно, злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль, которая экспрессирует или для которой показана экспрессия изоформы ED-A фибронектина, изоформы ED-B фибронектина и/или альтернативно сплайсированного тенасцина С. Более предпочтительно злокачественная опухоль экспрессирует изоформу ED-A фибронектина. Например, злокачественная опухоль может представлять собой

15 любой тип солидной или несолидной злокачественной опухоли или злокачественной лимфомы. Злокачественная опухоль может быть выбрана из группы, состоящей из рака кожи (в частности, меланомы), рака головы и шеи, рака почки, саркомы, герминомы (такой как тератокарцинома), рака печени, лимфомы (такой как лимфома Ходжкина или неходжкинская лимфома), лейкоза (например, острого миелоидного

20 лейкоза), рака кожи, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака тела матки, рака яичника, рака предстательной железы, рака легкого, рака ободочной и прямой кишки, рака шейки матки, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака желудка и рака головного мозга. Злокачественные опухоли могут быть семейными или спорадическими. Злокачественные опухоли могут быть метастазирующими или не

25 метастазирующими. Предпочтительно, злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль, выбранную из группы, состоящей из меланомы, рака головы и шеи, рака почки и саркомы. Указание на злокачественную опухоль, упоминаемую выше, обычно относится к злокачественной трансформации рассматриваемых клеток. Таким образом, рак почки, например, относится к злокачественной трансформации

30 клеток почки. Рак может находиться в первичном расположении, таком как почка в случае рака почки, или в отдаленном положении в случае метастазов. Опухоль, упоминаемая в настоящем описании, может быть результатом любой из злокачественных опухолей, упоминаемых выше. Предпочтительно, опухоль является результатом меланомы, рака головы и шеи, рака почки или саркомы. Опухоль, которая является

35 результатом конкретной злокачественной опухоли, включает как первичную опухоль, так и метастазы указанной злокачественной опухоли. Таким образом, опухоль, которая является результатом рака головы и шеи, например, включает как первичную опухоль головы и шеи, так и метастазы рака головы и шеи, находящиеся в других частях тела пациента.

40 Конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут обладать противоопухолевой активностью и, таким образом, применимы для лечения злокачественной опухоли. Не ограничиваясь каким-либо теоретическим объяснением, ожидается, что конъюгаты будут демонстрировать мощную противоопухолевую активность в результате превосходных свойств нацеливания на опухоль, как продемонстрировано в примерах

45 3 и 4 ниже. Таким образом, конъюгаты, описанные в настоящем описании, конструируют для применения в способах лечения пациентов, предпочтительно пациентов-людей. Конъюгаты по настоящему изобретению, в частности, можно использовать для лечения злокачественной опухоли.

Таким образом, изобретение относится к способам лечения, включающим введение конъюгата, описанного в настоящем описании, к фармацевтическим композициям, содержащим такие конъюгаты, и к применению таких конъюгатов для изготовления лекарственного средства для введения, например, в способе получения лекарственного средства или фармацевтической композиции, включающем составление конъюгата с фармацевтически приемлемым эксципиентом. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны и могут быть приспособлены специалистом в данной области в зависимости от природы и способа введения выбранного активного соединения(ий).

Конъюгаты, описанные в настоящем описании, обычно вводят в форме

- 5 фармацевтической композиции, которая может содержать по меньшей мере один компонент в дополнение к молекуле антитела. Таким образом, фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, и для применения в соответствии с настоящим изобретением, могут содержать, в дополнение к активному ингредиенту, фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель, буфер, стабилизатор или другие
- 10 материалы, хорошо известные специалистам в данной области. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны препятствовать эффективности активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала зависит от пути введения, который может представлять собой инъекцию, например, внутривенную, внутриопухоловую или подкожную. Предпочтительно, конъюгат по настоящему изобретению вводят
- 15 внутрь опухоли.

Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, вазелин, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, декстроза или другой раствор сахарида или гликоли, такие как этиленгликоль,

25 пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Для внутривенной инъекции или инъекции в пораженную область, активный ингредиент может иметь форму парентерально приемлемого водного раствора, который является свободным от пирогенов и имеет подходящее значение pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области способны получить подходящие растворы

30 с использованием, например, изотонических носителей, таких как хлорид натрия инъекционный, раствор Рингера инъекционный, лактатный раствор Рингера инъекционный. При необходимости можно добавить консерванты, стабилизаторы, буфера, антиоксиданты и/или другие добавки. Специалистам в данной области известно множество способов получения фармацевтических составов. См. например Robinson

35 ed., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Композицию, содержащую конъюгат, описанный в настоящем описании, можно вводить отдельно или в комбинации с другими способами лечения злокачественной опухоли, одновременно или последовательно, или в качестве комбинированного

40 препарата с другим терапевтическим средством или средствами, для лечения злокачественной опухоли. Например, конъюгат по изобретению можно использовать в комбинации с существующим терапевтическим средством от злокачественной опухоли.

Конъюгат, описанный в настоящем описании, можно использовать для производства лекарственного средства. Лекарственное средство может быть предназначено для

45 раздельного или комбинированного введения индивидууму и, таким образом, может содержать конъюгат и дополнительный компонент в качестве комбинированного препарата или в качестве раздельных препаратов. Раздельные препараты можно использовать для облегчения раздельного и последовательного или одновременного

введения, и они позволяют введение компонентов различными путями.

Композиции, описанные в настоящем описании, можно вводить млекопитающим, предпочтительно людям. Введение может осуществляться в "терапевтически эффективном количестве", являющемся достаточным для того, чтобы демонстрировать

- 5 пользу для пациента. Такая польза может представлять собой по меньшей мере смягчение по меньшей мере одного симптома. Таким образом, "лечение" определенного заболевания относится к смягчению по меньшей мере одного симптома. Фактическое вводимое количество и скорость и расписание введений, будут зависеть от природы и тяжести подвергаемого лечению заболевания, конкретного подвергаемого лечению
- 10 пациента, клинического состояния отдельного пациента, причины нарушения, области доставки композиции, типа конъюгата, способа введения, расписания введения и других факторов, известных медицинским специалистам. Ответственность за назначение лечения, например, решение о дозировке и т.д. несут врачи общей практики и другие медицинские врачи, и оно может зависеть от тяжести симптомов и/или прогрессирования
- 15 заболевания, подвергаемого лечению. Подходящие дозировки антитела хорошо известны в данной области (Ledermann et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; и Bagshawe et al. (1991) Antibody, Immunoconjugate and Radiopharmaceuticals 4: 915-922). Можно использовать конкретные дозировки, указанные в настоящем описании или в Physician's Desk Reference (2003) в зависимости от типа вводимого лекарственного средства. Терапевтически
- 20 эффективное количество или подходящую дозу конъюгата для применения, как описано в настоящем описании, можно определять путем сравнения его активности *in vitro* и активности *in vivo* в модели на животных. Известны способы экстраполяции эффективных дозировок у мышей и других исследуемых животных для человека. Точная доза зависит от ряда факторов, включая то, предназначено ли антитело для диагностики,
- 25 предупреждения или лечения, размер и положение области, подлежащей лечению, точную природу конъюгата. Для системного применения типичная доза конъюгата находится в диапазоне от 10 мкг до 500 мкг/кг. Можно вводить изначальную более высокую нагрузочную дозу, за которой следует одна или несколько более низких доз. Она представляет собой дозу для однократного лечения взрослого пациента, которую
- 30 можно пропорционально корректировать для детей и младенцев, а также корректировать в зависимости от формата конъюгата пропорционально молекулярной массе. Лечение можно повторять с интервалами раз в сутки, два раза в неделю, раз в неделю или месяц по усмотрению врача. Лечение может осуществляться каждые от двух до четырех недель для подкожного введения и каждые от четырех до восьми недель для
- 35 внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лечение является периодическим и период между введениями составляет две недели или более, например, приблизительно три недели или более, приблизительно четыре недели или более, или приблизительно один месяц. В других вариантах осуществления изобретения лечение можно проводить до и/или после хирургической операции и можно
- 40 проводить или применять непосредственно в анатомической области хирургического лечения.

Следующие аспекты и варианты осуществления изобретения станут понятными специалистам в данной области с учетом настоящего описания, включающего следующий экспериментальный раздел.

- 45 Все документы, упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме для всех целей.

"И/или", когда используется в настоящем описании, следует понимать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с или без другого.

Например, "А и/или В" следует понимать как конкретное описание каждого из (i) А, (ii) В и (iii) А и В, как если бы каждый из них был указан в настоящем описании индивидуально.

Если контекст не указывает на иное, описание и определение признаков, как указано выше, не ограничивается каким-либо конкретным аспектом или вариантом осуществления изобретения и применим в равной степени ко всем аспектам и вариантам осуществления, которые описаны.

Определенные аспекты и варианты осуществления изобретения далее проиллюстрированы в качестве примера и с отсылкой на чертежи, описанные выше.

Примеры

Пример 1 - Получение и анализ коньюгата huIL2-F8-huTNF α , коньюгатов huIL2-F8-мутант huTNF α , коньюгата huIL2-L19-huTNF α и коньюгата huIL2-L19-мутант huTNF α .

Различные коньюгаты с мутантами TNF α человека получали и охарактеризовывали посредством FPLC, SDS-PAGE и MS. Результаты обобщенно представлены в таблице

1. Небольшая экспрессия или отсутствие экспрессии мутанта R32W наблюдали в случае любого из иммуноцитокинов IL2-L19-TNF α или IL2-F8-TNF α . Выход мутанта R32A был неожиданно высоким для обоих иммуноцитокинов.

	Белок	Мутация	Буфер для диализа	Выход (мг/л)	Профиль FPLC	SDS-PAGE	MS	SEQ ID NO
20	1 IL2-L19-TNF α	-	PBS	1,6	П	П	П	70
	2 IL2-L19-TNF α	R32W	PBS	0,4	П	П	П	64
	3 IL2-L19-TNF α	R32A	PBS	2,2	П	П	П	44
	4 IL2-F8-TNF α	-	PBS	1,4	П	П	П	1
25	5 IL2-F8-TNF α	R32W	PBS	-	О	О	О	58
	6 IL2-F8-TNF α	R32A	PBS	3,4	П	П	П	36
	7 IL2-F8-TNF α	R32F	MES	1,9	П	П	П	60
	8 IL2-F8-TNF α	R32V	MES	3,2	П	П	П	62

Таблица 1

Пример 2 - Эффект формата коньюгата на активность уничтожения клеток

Слитые белки смогли экспрессировать и очистить до однородного состояния.

Очищенный коньюгат huIL2-F8-huTNF α (SEQ ID NO: 1) и коньюгат huIL2-F8-мутант huTNF α (R32A) (SEQ ID NO: 36) анализировали с использованием стандартного эксперимента на системе ÄKTA-FPLC с колонкой Superdex 200 HR 10/30 и охарактеризовывали посредством анализа SDS-PAGE в не восстанавливающих и восстанавливающих условиях.

Для тестирования значимости мутации TNF α в коньюгате активности уничтожения клеток активность двух слитых белков тестировали в анализе уничтожения клеток с использованием клеточной линии фибробластов L M. Анализ проводили в присутствии 2 мкг/мл актиномицина D (Sigma-Aldrich). Клетки высевали в 96-луночные планшеты в культуральную среду, дополненную возрастающими концентрациями huIL2-F8-huTNF α (SEQ ID NO: 1) или huIL2-F8-huTNF α (R32A) (SEQ ID NO: 36), как указано на фиг.1.

Антитело F8 имело формат scFv во всех протестированных коньюгатах. Результаты представлены на фиг.1. Результаты выражены в качестве процента жизнеспособности клеток по сравнению с клетками, обработанными только актиномицином D (использованным в качестве отрицательного контроля). Результаты демонстрируют, что активность уничтожения клеток коньюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R32A) была более низкой по сравнению с коньюгатом huIL2-F8-huTNF α , как можно видеть из величин EC50, приведенных на фиг.1. Величина EC50 отражает концентрацию лекарственного средства, требуемую для полумаксимальной активности.

Пример 3 - Анализ биораспределения конъюгата huIL2-F8- мутант huTNF (R32A)

Эффективность нацеливания *in vivo* конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF (R32A)

оценивали посредством анализа биораспределения. Слитый белок очищали

эксклюзионной хроматографией, а затем метили радиоактивным йодом посредством

йода-125. Всего 12 мкг (~9,6 мКи) препарата слитого белка инъецировали в хвостовую

вену иммунокомпетентных мышей 129Sv, имеющих подкожно имплантированные

тератокарциномы мыши F9. Через 24 ч после инъекции мышей умерщвляли. Органы

взвешивали и определяли радиоактивность с использованием гамма-счетчика Packard

Cobra. Уровень радиоактивности в соответствующих органах регистрировали и

выражали в качестве процента инъецированной дозы на грамм ткани (%ID/g). Результаты

демонстрируют предпочтительное и селективное накопление конъюгата huIL2-F8-

мутант huTNF α (R32A) в опухоли (фиг.2).

Пример 4 - Получение и анализ конъюгатов huIL2-L19-мутант huTNF α (R32A)

Охарактеризация белка

Слитый белок huIL2-L19-huTNF α (R32A) (SEQ ID NO: 44) очищали из клеточной

культуральной среды до однородного состояния посредством хроматографии с белком

A и анализировали посредством SDS-PAGE, ESI-MS и эксклюзионной хроматографии

(Superdex200 10/300GL, GE Healthcare).

Биологическую активность TNF и IL2 определяли на клетках HT1080 и CTLL2,

соответственно.

Конъюгат huIL2-L19-мутант huTNF α (R32A) имел хорошие характеристики в

биохимических анализах, селективно локализовался в солидных опухолях *in vivo* и

проявлял согласованную активность *in vitro* частей IL2 и TNF при использовании

клеточных анализов на основе пролиферации лимфоцитов CTLL-2 мыши (фиг.3) и на

основе уничтожения опухолевой клеточной линии человека HT-1080 (фиг.4).

Исследования биораспределения

Эффективность нацеливания на EDB *in vivo* конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF

(R32A) оценивали посредством анализа биораспределения. 10 мкг меченого

радиоактивным йодом слитого белка инъецировали в латеральную хвостовую вену

мышей, имеющих опухоль F9. Мышей умерщвляли через 24 ч после инъекции, органы

извлекали, взвешивали и определяли радиоактивность органов и опухолей с

использованием счетчика Cobra γ и выражали в качестве процента от исходной дозы

на грамм ткани (%ID/g \pm SEM), (n=3 мыши на группу). Результаты демонстрируют

предпочтительное и селективное накопление конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α

(R32A) в опухоли (фиг.5).

Список последовательностей

1. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-huTNF α [растворимая форма] (SEQ ID NO: 1)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-huTNF α [растворимая

форма] (IL2 человека - линкер - VH F8 - линкер - VL F8 - линкер - TNF α человека

[растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты.

TNF α человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ

45 CLEEEELKPLEEVNLQAQSKNFHLRPRDLISNINVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL

NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTM

SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA

VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSSLSPGER

ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLIYGA
SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGT
KVEIKSSSSGSSSSGSSSGVRSSRTPSDKPVAH
VVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRD
NQLVVPSEGLYLIYSQVLFKQGCPST
HVLLHTISRIA
SYQTKVNL
SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVF
QLEKGDR
5 SAEINRPDYLDFAESGVYFGIIAL

2. Аминокислотная последовательность домена VH F8 (SEQ ID NO: 2)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
FSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLV
TVSS

10 3. Аминокислотная последовательность линкера, связывающего домен VH с доменом
VL антитела (SEQ ID NO: 3)

GGGGSGGGGGGGGG

4. Аминокислотная последовательность домена VL F8 (SEQ ID NO: 4)

EIVLTQSPGTL
LSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQK
PGQAPRLIYGA
SSRATG

15 IPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQG
TKVEIK

5. Аминокислотная последовательность scFv F8 (SEQ ID NO: 5)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
FSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLV
TVSSGGGGSGGGGGGGGEIVLTQSPGTL
LSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQK
P

20 GQAPRLIYGA
SSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQ
GTKVEIK

6. Аминокислота последовательности CDR F8

CDR1 VH F8- LFT (SEQ ID NO: 6)

CDR2 VH F8 - SGSGGS (SEQ ID NO: 7)

25 CDR3 VH F8 - STHLYL (SEQ ID NO: 8)

CDR1 VL F8 - MPF (SEQ ID NO: 9)

CDR2 VL F8 - GASSRAT (SEQ ID NO: 10)

CDR3 VL F8 - MRGRPP (SEQ ID NO: 11)

7. Аминокислотная последовательность IL2 человека (huIL2) в конъюгатах (SEQ ID
NO: 12)

APTSSTKKTQLQLEHLLL
DLQMILNGINNYKNPKL
TRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEV
LNLAQSKNFHLRPRDL
ISNINV
VLELGSETTFMCEYA
DETATIVEFL
NRWITFCQS
IISTLT

8. Аминокислотная последовательность линкера, связывающего молекулу антитела
и IL2 и/или мутант TNF (SEQ ID NO: 13)

GDGSSGGSGGAS

9. Аминокислотная последовательность линкера, связывающего молекулу антитела
и IL2 и/или мутант TNF (SEQ ID NO: 14)

SSSSGSSSSGSSSSG

40 10. Аминокислотная последовательность растворимой формы внеклеточного домена
TNFa человека (huTNFa) (SEQ ID NO: 15)

VRSSSRT
PSDKPV
AHVVANPQAEGQLQWLN
RRANALLANGVELRD
NQLVVPSEGLY
LIYSQVL
FKQGCPSTH
VLLHTISRIA
SYQTKVNL
SAIKSPCQRET
PEGAEAKPWYE
PIYLGGVF
QLEKGDR
LSAEINRPDYLDFA
ESGVYFGIIAL

45 11. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-huTNFa [внеклеточный
домен] (SEQ ID NO: 16)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-huTNFa [внеклеточный
домен] (IL2 человека - линкер- VH F8- линкер - VL F8 - линкер - TNFa человека

[внеклеточный домен]) представлена ниже. Линкерные последовательности почеркнуты. TNF α человека в этом коньюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGKSETTFMCEYADETATIVEFL

5 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGGGEIVLTQSPGTLSSLSPGER
ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSGPQREEFPRLDSLISP
10 LAQAVRSSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSE
GLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA VSYQTKVNL SAI KSPCQRETPEGAEAKP
WYEPIYLGGVFQLEKGDR LSAE INRPDYL DFAES GQVYFGII AL

12. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена TNF α человека (huTNF α) (SEQ ID NO:17)

15 GPQREEFPRLS LISPLAQAVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRANALL
ANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA VSYQTKVNL SAI
KSPCQRETPEGAEAKP WYEPIYLGGVFQLEKGDR LSAE INRPDYL DFAES GQVYFGII AL

13. Аминокислотная последовательность CDR L19

CDR1 VH L19 - Ser Phe Ser Met Ser (SEQ ID NO: 18)

20 CDR2 VH L19 - Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys (SEQ ID NO: 19)

CDR3 VH L19 - Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr (SEQ ID NO: 20)

CDR1 VL L19 - Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Phe Leu Ala (SEQ ID NO: 21)

CDR2 VL L19 - Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr (SEQ ID NO: 22)

25 CDR3 VL L19 - Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr (SEQ ID NO: 23)

14. Аминокислотная последовательность домена VH L19 (SEQ ID NO: 24)

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

30 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

Thr Val Ser Ser

35 15. Аминокислотная последовательность домена VL L19 (SEQ ID NO: 25)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

40 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

16. Аминокислотная последовательность scFv(L19) (SEQ ID NO: 26)

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Ala Ser
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 5 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro
 10 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

17. Аминокислотная последовательность CDR F16

CDR1 VH F16- RYGMS (SEQ ID NO: 27)

CDR2 VH F16- AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 28)

CDR3 VH F16- AHNAFDY (SEQ ID NO: 29)

15 CDR1 VL F16- QGDSSLRSYYAS (SEQ ID NO: 30)

CDR2 VL F16- GKNNRPS (SEQ ID NO: 31)

CDR3 VL F16- NSSVYTMPPVV (SEQ ID NO: 32)

18. Аминокислотная последовательность домена VH F16 (SEQ ID NO: 33)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG

20 STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVT
 VSR

19. Аминокислотная последовательность домена VL F16 (SEQ ID NO: 34)

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYKKNRPSGI
 PDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDAEADYYCNSSVYTMPPVFGGGTKLTVLG

25 20. Аминокислотная последовательность scFv(F16) (SEQ ID NO: 35)

Линкерная последовательность доменов VH и VL показана подчеркиванием

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG
 STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVT
 VSRRGGGGGGSGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV

30 VIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDAEADYYCNSSVYTMPPVFGGGTK
 LTVLG

21. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R32A)
 [растворимая форма] (SEQ ID NO: 36)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R32A)

35 [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH F8 - линкер - VL F8 - линкер - мутант
 TNF α (R32A) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные
 последовательности подчеркнуты и R32A подчеркнута и выделена полужирным
 шрифтом. Мутант TNF α (R32A) человека в этом конъюгате представляет собой
 растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

40 APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSLFTM
 SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAKSTHLYLFDWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGGGGEIVLTQSPGTLSSLSPGER
 45 ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
 LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSRTPSDKPVAH
 VVANPQAEGQLQWLNRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGGLIYSQVLFKQGCPST
 HVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDR

SAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

22. Аминокислотная последовательность растворимой формы внеклеточного домена мутанта TNF α человека (R32A) (huTNF α R32A) (SEQ ID NO: 37). R32A подчеркнут полужирным шрифтом.

5 VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSEGL
YLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWY
EPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

23. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R52A) (huTNF α R52A) [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 38)

10 Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R52A) [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH F8 - линкер - VL F8 - линкер - мутант TNF α (R52A) человека [внеклеточный домен]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R52A выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α (R52A) человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен

15 TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSFLTM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
20 VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTIVTSSGGGSGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSSLSPGER
ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPFGQGTKVEIKSSSSGSSSGSSSGGPQREEFPRDLSLISP
LAQAVRSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSE
GLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP
25 WYEPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

24. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена мутанта TNF α (R52A) человека (huTNF α R52A) [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 39). R52A подчеркнут и выделен полужирным шрифтом.

30 GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRANALL
ANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA SYQTKVNLLSAI
KSPCQRETPEGAEAKPWEPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

25. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R32A) [растворимая форма] (SEQ ID NO: 40)

Аминокислотная последовательность конъюгатаа huIL2-F16-мутант huTNF α (R32A)
35 [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH F16 - линкер - VL F16 - линкер - мутант TNF α (R32A) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R32A подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

40 APTSSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSRYG
MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCAKAHNAFDYWGQGTIVTSSGGGSGGGSGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITC
45 QGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVVIYGNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED
EADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTKLTVLGSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPVAHVV
ANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHV
LLHTISRIA SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWEPIYLGGVFQLEKGDRSLA

EINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

26. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R52A) [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 41)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R52A)

5 [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH F16 - линкер - VL F16 - линкер - мутант TNF α (R52A) человека) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R52A подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ

10 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCAKAHNAFDYWGGQTLTVSRGGSGGGSGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITC
QGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED
15 EADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTKLTVLGSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISPLA
QAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSEGL
YLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWY
EPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

27. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32A)

20 [растворимая форма] (SEQ ID NO: 42)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32A) [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер - мутант TNF α (R32A) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R32A подчеркнут и выделен полужирным шрифтом.

25 Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSFSM
30 SWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCAKPFPYFDYWGGQTLTVSSGDGSSGGASEIIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC
RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF
AVYYCQQTGRIPPTFGQGKTVEIKSSSSGSSSSGSSSGVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQA
EGQLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTI
35 SRIA SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPD
YLDFAESGQVYFGIIAL

28. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R52A) [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 43)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R52A)

40 [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер - мутант TNF α (R52A) человека) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R52A подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ

45 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSFSM
SWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCAKPFPYFDYWGGQTLTVSSGDGSSGGASEIIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC

RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDF
 AVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSGSSSGSSSGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRS
 SSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQ
 VLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA SYQTKVNL SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLG
 5 GVFQLEKGDR LSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

29. Аминокислотная последовательность коньюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32A) [растворимая форма] (SEQ ID NO: 44)

Аминокислотная последовательность коньюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32A) [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер - мутант TNF α (R32A) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R32A подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом коньюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

APTSSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ

15 CLEEEELKPLEEVNL AQS KNFHL RPRDL ISNINV VLE LGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGEVQLLES GGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSS
 FSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCAKPF PYFDYWGQGT LTVSSGDGSSGGASEI VLTQSPGTL SLSPGERAT
 LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEP
 20 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSGSSSGSSSGVRSSSRPSDKPVAHVVAN
 PQAEGQLQWLNAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLL
 HTISRIA SYQTKVNL SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDR LSAEINR
 PDYLDFAESGQVYFGIIAL

30. Аминокислотная последовательность коньюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R52A)

25 [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 45)

Аминокислотная последовательность huIL2-L19-мутант huTNF α (R52A) [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер - мутант TNF α (R52A) человека) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R52A подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом коньюгате

30 представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNL AQS KNFHL RPRDL ISNINV VLE LGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGEVQLLES GGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSS
 FSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
 35 DTAVYYCAKPF PYFDYWGQGT LTVSSGDGSSGGASEI VLTQSPGTL SLSPGERAT
 LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEP
 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSGSSSGSSSGPQREEFPRDLSLISPLAQA
 VRSSSRPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLI
 YSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA SYQTKVNL SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPI
 40 YLGGVFQLEKGDR LSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

31. Аминокислотная последовательность scFv(F16) (SEQ ID NO: 46)

Линкерная последовательность доменов VH и VL показана подчеркиванием

EVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GG
 STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHN AF DYWGQGT LVT
 45 VSRRGGGGSGGGSGGGGS ELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSL RSYY ASWYQQKPG
 QAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQA EDEADYYCNSSVY TMPPVVFG
 GGTKLTVLG

32. Аминокислотная последовательность коньюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R32A)

[растворимая форма] (SEQ ID NO: 47)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R32A) [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH F16 - линкер - VL F16 - линкер - мутант TNF α (R32A) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные

последовательности подчеркнуты и R32A подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
 MSWVRQAPGKGLEWVAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKAHNAFDYWGQGTLTVSRGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQT
 VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
 QAEDEADYYCNSSVYTMPVVFGGKLTVLGSSSGSSSSGSSSGVRSSSRTPSDKPV
 AHVVANPQAEGQLQWLNRRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCP
 STHVLLTHTISRIAQSQTGVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGD
 RLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI

33. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R52A) [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 48)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R52A) [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH F16 - линкер - VL F16 - линкер - мутант TNF α (R52A) человека) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R52A подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
 MSWVRQAPGKGLEWVAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKAHNAFDYWGQGTLTVSRGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQT
 VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
 QAEDEADYYCNSSVYTMPVVFGGKLTVLGSSSGSSSSGSSSSGQPREEFPRDLSL
 ISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRAANALLANGVELRDNQLVVP
 SEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLHTISRIAQSQTGVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK
 PWYEPIYLGGVFQLEKGDRSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI

34. Аминокислотная последовательность линкера, связывающего молекулу антитела и IL2 и/или мутант TNF (SEQ ID NO: 49)

GGGGSGGGGSGGGG

35. Аминокислотная последовательность линкера, связывающего домен VH с доменом VL антитела (SEQ ID NO: 50)

GDGSSGGSGGAS

36. Аминокислотная последовательность линкера, связывающего домен VH с доменом VL антитела (SEQ ID NO: 51)

GGGSGGGSGG

37. Аминокислотная последовательность растворимой формы внеклеточного домена

45 мутанта TNF α человека (R32W) (huTNF α R32W) (SEQ ID NO: 52). R32W подчеркнут и выделен полужирным шрифтом.

VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRWANALLANGVELRDNQLVVPSEGL
 YLIYSQVLFKGQGCPSTHVLHTISRIAQSQTGVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWY

EPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

38. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена мутанта TNF α (R52W) человека (huTNF α R52W) (SEQ ID NO: 53). R52W подчеркнут и выделен полужирным шрифтом.

5 GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRWANALL
ANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA**S**YQTKVNL^{LL}SAI
KSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

39. Аминокислотная последовательность растворимой формы внеклеточного домена мутанта TNF α (R32F) человека (huTNF α R32F) (SEQ ID NO: 54). R32F подчеркнут и выделен полужирным шрифтом.

10 VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSEGLY
LIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA**S**YQTKVNL^{LL}SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYE
PIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

40. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена мутанта TNF α (R52F) человека (huTNF α R52F) (SEQ ID NO: 55). R52F подчеркнут и выделен полужирным шрифтом.

GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRFANALL
ANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA**S**YQTKVNL^{LL}SAI
KSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

20 41. Аминокислотная последовательность растворимой формы внеклеточного домена мутанта TNF α (R32V) человека (huTNF α R32V) (SEQ ID NO: 56). R32V подчеркнут и выделен полужирным шрифтом.

VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRVANALLANGVELRDNQLVVPSEGLY
LIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA**S**YQTKVNL^{LL}SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

42. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена мутанта TNF α (R52V) человека (huTNF α R52V) (SEQ ID NO: 57). R52V подчеркнут и выделен полужирным шрифтом.

GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRVANALL
30 ANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA**S**YQTKVNL^{LL}SAI
KSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

43. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R32W) [растворимая форма] (SEQ ID NO: 58)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R32W) [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH F8 - линкер - VL F8 - линкер - мутант TNF α (R32W) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R32W подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α (R32W) человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

40 APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELG**S**ETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTS^{LF}FTM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCAKSTHLYLFDYWQGQTLTVSSGGGGSGGGGG**E**IVLTQSPGTLSSLSPGER

45 ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIY**G**ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSRTPSDKPVAH
VVANPQAEGQLQWLNRWANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPST
HVLLHTISRIA**S**YQTKVNL^{LL}SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDR

SAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

44. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R52W) [huTNF α R52W] [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 59)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R52W)

[внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH F8 - линкер - VL F8 - линкер - мутант TNF α (R52W) человека [внеклеточный домен]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R52W подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α (R52W) человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFKHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSLFTM
 SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGGGEIVLTQSPGTLSSLSPGER
 ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
 LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSGPQREEFPRDLSLISP
 LAQAVRSSRTPSDKPVAVVANPQAEGQLQWLNRWANALLANGVELRDNQLVVPSE
 GLYLIYSQVLFKQGCPSTHVLLHTISRIAQSQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP
 WYEPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

45. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R32F) [растворимая форма] (SEQ ID NO: 60)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R32F)

[растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH F8 - линкер - VL F8 - линкер - мутант TNF α (R32F) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R32F подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α (R32F) человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

APTSSTKKTQLLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFKHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSLFTM
 SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGGGEIVLTQSPGTLSSLSPGER
 ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
 LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGKVEIKSSSSGSSSSGSSSGVRSSRTPSDKPVAVH
 VVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKQGCPSTH
 VLLHTISRIAQSQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRSL
 AEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

46. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R52F) [huTNF α R52F] [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 61)

40 Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R52F) [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH F8 - линкер - VL F8 - линкер - мутант TNF α (R52F) человека [внеклеточный домен]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R52F подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α (R52F) человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFKHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSLFTM

SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLTVSSGGGSGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSSLSPGER
 ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISR
 LEPEDFAVYYCQQMQRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSGSSSGGPQREEFPRDLSLISP
 5 LAQAVRSSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSE
 GLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP
 WYEPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

47. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R32V) [растворимая форма] (SEQ ID NO: 62)

10 Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R32V) [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH F8 - линкер - VL F8 - линкер - мутант TNF α (R32V) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R32V подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α (R32V) человека в этом конъюгате представляет собой растворимую

15 форму внеклеточного домена TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSLFTM
 SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
 20 VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLTVSSGGGSGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSSLSPGER
 ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISR
 LEPEDFAVYYCQQMQRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSGSSSGVRSSSRTPSDKPVAH
 VVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPST
 HVLLHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDR
 25 SAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

48. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R52V) (huTNF α R52V) [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 63)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R52V) [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH F8 - линкер - VL F8 - линкер - мутант TNF α (R52V) человека [внеклеточный домен]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R52V подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α (R52V) человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 35 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSLFTM
 SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLTVSSGGGSGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSSLSPGER
 ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISR
 40 LEPEDFAVYYCQQMQRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSGSSSGGPQREEFPRDLSLISP
 LAQAVRSSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSE
 GLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP
 WYEPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

49. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32W) [растворимая форма] (SEQ ID NO: 64)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32W) [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер - мутант TNF α (R32W) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные

последовательности подчеркнуты и R32W подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ

5 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
FSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAKPFPYFDYWGQGTIVSSGDGSSGGASEIVLTQSPGTLSSLSPGERAT
LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEP
10 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRPSDKPVAVVAN
PQAEGQLQWLNRWANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLL
THTISRIA VSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRSLAEIN
RPDYLDFAESGQVYFGIIAL

50. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α

15 (R52W) [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 65)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R52W) [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер - мутант TNF α (R52W) человека) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R52W подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α

20 человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ

CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
FSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
25 DTAVYYCAKPFPYFDYWGQGTIVSSGDGSSGGASEIVLTQSPGTLSSLSPGERAT
LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEP
EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKSSSGSSSSGSSSSGPQREEFPRDLSLISPLAQA
VRSSSRPSDKPVAVVANPQAEGQLQWLNRWANALLANGVELRDNQLVVPSEGLY
IYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIA VSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPI
30 YLGGVFQLEKGDRSLAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

51. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32F) [растворимая форма] (SEQ ID NO: 66)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32F) [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер - мутант TNF α (R32F) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R32F подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ

40 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
FSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAKPFPYFDYWGQGTIVSSGDGSSGGASEIVLTQSPGTLSSLSPGERAT
LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEP
45 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRPSDKPVAVVAN
PQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLT
HTISRIA VSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRSLAEINR
PDYLDFAESGQVYFGIIAL

52. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R52F) [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 67)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R52F) [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер -

5 мутант TNF α (R52F) человека) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и the R52F подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. The human TNF α mutant в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 10 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
 FSMSWVRQAPGKGLEVVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCAKPFYFDYWGQGTLTVSSGDGSSGGASEIVLTQSPGTLSSLSPGERAT
 LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEP
 15 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKSSSSGSSSSGSSSSGPQREEFPRDLSLISPLAQAA
 VRSSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVPSEGLYLI
 YSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPI
 YLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

53. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32V) [растворимая форма] (SEQ ID NO: 68)

20 Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32V) [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер - мутант TNF α (R32V) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R32V подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму

25 внеклеточного домена TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
 30 FSMSWVRQAPGKGLEVVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCAKPFYFDYWGQGTLTVSSGDGSSGGASEIVLTQSPGTLSSLSPGERAT
 LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEP
 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPVAHVAN
 35 PQAEGQLQWLNRVANALLANGVELRDNQLVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLL
 HTISRIA SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINR
 PDYLDFAESGQVYFGIIAL

54. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R52V) [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 69)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R52V) [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер -

40 мутант TNF α (R52V) человека) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R52V подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 45 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
 FSMSWVRQAPGKGLEVVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCAKPFYFDYWGQGTLTVSSGDGSSGGASEIVLTQSPGTLSSLSPGERAT
 LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEP

EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSGSSSSGSSSSGPQREEFPRDLSLISPLAQA
 VRSSSRPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRVANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLI
 YSQVLFKGQGCPSTHVLLHTSRIA SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPI
 YLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

- 5 55. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-huTNF α [растворимая форма] (SEQ ID NO: 70)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-huTNF α [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер - TNF α человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты.

- 10 TNF α человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVNLNAQSKNFKLPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
 15 FSMSWVRQAPGKGLEVVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCAKPFYFDYWQGTLTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSSPGERAT
 LSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEP
 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRPSDKPVAHVVAN
 20 PQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLT
 HTISRIA SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINR
 PDYLDFAESGQVYFGIIAL

56. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-huTNF α [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 71)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-huTNF α [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер - TNF α человека) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты. TNF α человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVNLNAQSKNFKLPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 25 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
 FSMSWVRQAPGKGLEVVSSISGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCAKPFYFDYWQGTLTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSSPGERAT
 LSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEP
 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSGSSSSGSSSSGPQREEFPRDLSLISPLAQA
 35 VRSSSRPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLI
 YSQVLFKGQGCPSTHVLLHTSRIA SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPI
 YLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

57. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R32W) [растворимая форма] (SEQ ID NO: 72)

- 40 Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R32W) [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH F16 - линкер - VL F16 - линкер - мутант TNF α (R32W) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R32W подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVNLNAQSKNFKLPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG

MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKAHNAFDYWGQGTLTVSRGGGGSGGGSGGGSELTQDPAVSVALGQT
 VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
 QAEDEADYYCNSSVYTMPPVFGGGTKLTVLGSSSGSSSGSSSGVRSSSRTPSDKPV
 5 AHVVANPQAEGQLQWLNRWANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGQGCP
 STHVLLTHTISRIAQSQTGVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGD
 RLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

58. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α
 (R52W) [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 73)

10 Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R52W)
 [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH F16 - линкер - VL F16 - линкер -
 мутант TNF α (R52W) человека) представлена ниже. Линкерные последовательности
 подчеркнуты и R52W подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α
 человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

15 APTSSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSSTTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
 MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKAHNAFDYWGQGTLTVSRGGGGSGGGSGGGSELTQDPAVSVALGQT
 20 VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
 QAEDEADYYCNSSVYTMPPVFGGGTKLTVLGSSSGSSSGSSSGPQREEFPRDLSL
 ISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRWANALLANGVELRDNQLVV
 PSEGLYLIYSQVLFGQGCPSTHVLLTHTISRIAQSQTGVNLLSAIKSPCQRETPEGAEA
 KPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

25 59. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R32F)
 [растворимая форма] (SEQ ID NO: 74)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R32F)
 [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH F16 - линкер - VL F16 - линкер - мутант
 TNF α (R32F) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные
 30 последовательности подчеркнуты и R32F подчеркнут и выделен полужирным шрифтом.
 Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму
 внеклеточного домена TNF α .

APTSSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSSTTFMCEYADETATIVEFL
 35 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
 MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKAHNAFDYWGQGTLTVSRGGGGSGGGSGGGSELTQDPAVSVALGQT
 VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
 QAEDEADYYCNSSVYTMPPVFGGGTKLTVLGSSSGSSSGSSSGVRSSSRTPSDKPV
 40 AHVVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGQGCP
 STHVLLTHTISRIAQSQTGVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGD
 RLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

60. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R52F)
 [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 75)

45 Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R52F)
 [внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH F16 - линкер - VL F16 - линкер -
 мутант TNF α (R52F) человека) представлена ниже. Линкерные последовательности
 подчеркнуты и R52F подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α

человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFKLPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDSSGGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
 5 MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKAHNADYWGQGTIVSRGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQT
 VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVIVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
 QAEDEADYYCNSSVYTMPVVFGGGTKLTVLGSSSGSSSGSSSGPQREEFPRDLSL
 ISPLAQAVRSSRTPSDKPVAVVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVP
 10 SEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA VSYQTKVNL SAIKSPCQRETPEGAEAK
 PWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

61. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R32V) [растворимая форма] (SEQ ID NO: 76)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R32V)

15 [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH F16 - линкер - VL F16 - линкер - мутант TNF α (R32V) человека [растворимая форма]) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R32V подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

20 APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFKLPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDSSGGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
 MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKAHNADYWGQGTIVSRGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQT
 25 VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVIVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
 QAEDEADYYCNSSVYTMPVVFGGGTKLTVLGSSSGSSSGSSSGVRSSRTPSDKPV
 AHVVANPQAEGQLQWLNRVANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLKGQGCP
 STHVLLHTISRIA VSYQTKVNL SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGD
 RLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

30 62. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R52V) [внеклеточный домен] (SEQ ID NO: 77)

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF α (R52V)

[внеклеточный домен] (IL2 человека - линкер - VH F16 - линкер - VL F16 - линкер - мутант TNF α (R52V) человека) представлена ниже. Линкерные последовательности подчеркнуты и R52V подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFKLPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDSSGGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
 40 MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKAHNADYWGQGTIVSRGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQT
 VRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVIVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
 QAEDEADYYCNSSVYTMPVVFGGGTKLTVLGSSSGSSSGSSSGPQREEFPRDLSL
 ISPLAQAVRSSRTPSDKPVAVVANPQAEGQLQWLNRVANALLANGVELRDNQLVVP
 45 SEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTISRIA VSYQTKVNL SAIKSPCQRETPEGAEAK
 PWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> PHILOGEN S.P.A.

<120> Иммуноконъюгаты IL2 и мутантного TNF
 <130> NRS/FP7322332
 <150> GB1618888.0
 <151> 2016-11-09
 5 <150> GB1712916.4
 <151> 2017-08-11
 <160> 77
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 10 <211> 557
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-huTNF-альфа
 15 [растворимая форма]
 <400> 1

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	
1															15	
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	
															20	
															25	
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	
															30	
															35	
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	
															40	
															45	
50																
55															60	
25	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
															65	
															70	
															75	
															80	
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	
															85	
															90	
															95	
30	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
															100	
															105	
															110	
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	
															115	
															120	
															125	
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Gly	Asp	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	
															130	
															135	
															140	
35	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
															145	
															150	
															155	
															160	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	
															165	
															170	
															175	
40	Phe	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Trp	
															180	
															185	
															190	
Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	
															195	
															200	
															205	
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	
															210	
															215	
															220	
45	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
															225	
															230	
															235	
															240	
Cys	Ala	Lys	Ser	Thr	His	Leu	Tyr	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
															245	
															250	
															255	

RU 2758139 C2

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 260 265 270
 Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
 275 280 285
 5 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 290 295 300
 Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 305 310 315 320
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
 10 325 330 335
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 340 345 350
 Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 355 360 365
 15 Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 370 375 380
 Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
 385 390 395 400
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
 20 405 410 415
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 420 425 430
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 435 440 445
 25 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 450 455 460
 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 465 470 475 480
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 30 485 490 495
 Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 500 505 510
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 515 520 525
 35 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 530 535 540
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 545 550 555
 <210> 2
 40 <211> 118
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность домена VH F8
 45 <400> 2
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe

	20	25	30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
5 50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
10 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
100	105	110	
Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 3			
15 <211> 14			
<212> БЕЛОК			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> Аминокислотная последовательность линкера, связывающего домен			
20 VH с доменом VL антитела			
<400> 3			
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
1 5 10			
<210> 4			
25 <211> 108			
<212> БЕЛОК			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> Аминокислотная последовательность домена VL F8			
30 <400> 4			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1 5 10 15			
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro			
20 25 30			
35 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35 40 45			
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
50 55 60			
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu			
40 65 70 75 80			
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro			
85 90 95			
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100 105			
45 <210> 5			
<211> 240			
<212> БЕЛОК			
<213> Искусственная последовательность			

<220>

<223> Аминокислотная последовательность scFv F8

<400> 5

	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
5	1			5							10				15	

	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Phe
				20					25				30			

	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40				45						

10	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50			55				60							

	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65				70					75				80		

	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
15					85				90				95			

	Ala	Lys	Ser	Thr	His	Leu	Tyr	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
					100				105				110			

	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
				115			120			125						

20	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser
					130		135			140						

	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser
	145				150				155			160				

	Val	Ser	Met	Pro	Phe	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala
25					165				170			175				

	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro
					180				185			190				

	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile		
				195			200			205						

30	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Met
				210			215			220						

	Arg	Gly	Arg	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
	225					230				235			240			

<210> 6

35 <211> 3

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 VH F8

40 <400> 6

Leu Phe Thr

1

<210> 7

<211> 6

45 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 VH F8

<400> 7
 Ser Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 8
 5 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDR3 VH F8
 10 <400> 8
 Ser Thr His Leu Tyr Leu
 1 5
 <210> 9
 <211> 3
 15 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDR1 VL F8
 <400> 9
 20 Met Pro Phe
 1
 <210> 10
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDR2 VL F8
 <400> 10
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 30 1 5
 <210> 11
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <223> CDR3 VL F8
 <400> 11
 Met Arg Gly Arg Pro Pro
 1 5
 40 <210> 12
 <211> 133
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Аминокислотная последовательность IL2 человека (huIL2) в
 конъюгатах
 <400> 12
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

RU 2758139 C2

1	5	10	15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys			
20	25	30	
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys			
5	35	40	45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys			
50	55	60	
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu			
65	70	75	80
10	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
	85	90	95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala			
	100	105	110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile			
15	115	120	125
Ile Ser Thr Leu Thr			
	130		
<210>	13		
<211>	12		
20	<212> БЕЛОК		
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> Аминокислотная последовательность линкера, связывающего молекулу антитела и IL2 и/или мутанта TNF			
25	<400> 13		
Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Ala Ser			
1	5	10	
<210>	14		
<211>	15		
30	<212> БЕЛОК		
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> Аминокислотная последовательность линкера, связывающего молекулу антитела и IL2 и/или мутанта TNF			
35	<400> 14		
Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly			
1	5	10	15
<210>	15		
<211>	157		
40	<212> БЕЛОК		
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> Аминокислотная последовательность растворимой формы внеклеточного домена TNF-альфа человека (huTNF-альфа)			
45	<400> 15		
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val			
1	5	10	15
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg			

RU 2758139 C2

	20	25	30
10	Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu		
	35	40	45
5	Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe		
	50	55	60
10	Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile		
	65	70	75
	Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala		
	85	90	95
15	Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys		
	100	105	110
20	Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys		
	115	120	125
	Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe		
	130	135	140
25	Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	145	150	155
	<210> 16		
	<211> 577		
30	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-huTNF-альфа [внеклеточный домен]		
35	<400> 16		
	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
	1	5	10
	20	25	30
40	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
	35	40	45
45	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
	50	55	60
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys		
	65	70	75
	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
	85	90	95
50	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
	100	105	110
55	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
	115	120	125
60	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
	130	135	140
65	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Ala		
	145	150	155
70	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
	165	170	175
75	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu		
	Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		

RU 2758 139 C2

	180	185	190
5	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
	195	200	205
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
	210	215	220
	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
	225	230	235
	Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
	245	250	255
10	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	260	265	270
	Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu		
	275	280	285
	Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln		
15	290	295	300
	Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
	305	310	315
	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile		
	325	330	335
20	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
	340	345	350
	Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln		
	355	360	365
	Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile		
25	370	375	380
	Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly		
	385	390	395
	Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro		
	405	410	415
30	Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro		
	420	425	430
	Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp		
	435	440	445
	Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg		
35	450	455	460
	Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser		
	465	470	475
	Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu		
	485	490	495
40	Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn		
	500	505	510
	Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly		
	515	520	525
	Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe		
45	530	535	540
	Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp		
	545	550	555
	Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala		

	565	570	575
	Leu		
	<210> 17		
	<211> 177		
5	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> Аминокислотная последовательность внеклеточного домена TNF-альфа (huTNF-альфа)		
10	<400> 17		
	Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro		
	1 5 10 15		
	Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro		
	20 25 30		
15	Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp		
	35 40 45		
	Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg		
	50 55 60		
	Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser		
20	65 70 75 80		
	Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu		
	85 90 95		
	Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn		
	100 105 110		
25	Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly		
	115 120 125		
	Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe		
	130 135 140		
	Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp		
30	145 150 155 160		
	Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala		
	165 170 175		
	Leu		
	<210> 18		
35	<211> 5		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> CDR1 VH L19		
40	<400> 18		
	Ser Phe Ser Met Ser		
	1 5		
	<210> 19		
	<211> 17		
45	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> CDR2 VH L19		

<400> 19
 Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 20
 5 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDR3 VH L19
 10 <400> 20
 Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 21
 <211> 12
 15 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDR1 VL L19
 <400> 21
 20 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDR2 VL L19
 <400> 22
 Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 30 1 5
 <210> 23
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <223> CDR3 VL L19
 <400> 23
 Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr
 1 5
 40 <210> 24
 <211> 116
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Аминокислотная последовательность домена VH L19
 <400> 24
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

RU 2758139 C2

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

⁵ Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
¹⁰ 85 90 95

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

¹⁵ <210> 25

<211> 108

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

²⁰ <223> Аминокислотная последовательность домена VL L19

<400> 25

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
²⁵ 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

³⁰ Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
³⁵ 100 105

<210> 26

<211> 236

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

⁴⁰ <223> Аминокислотная последовательность scFv(L19)

<400> 26

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

⁴⁵ Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

RU 2758139 C2

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Ala Ser
 10 115 120 125
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 130 135 140
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 145 150 155 160
 15 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 165 170 175
 Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 180 185 190
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 20 195 200 205
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro
 210 215 220
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 225 230 235
 25 <210> 27
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <223> CDR1 VH F16
 <400> 27
 Arg Tyr Gly Met Ser
 1 5
 <210> 28
 35 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDR2 VH F16
 40 <400> 28
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 29
 45 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> CDR3 VH F16
 <400> 29
 Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr
 1 5
 5 <210> 30
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <223> CDR1 VL F16
 <400> 30
 Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 1 5 10
 <210> 31
 15 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDR2 VL F16
 20 <400> 31
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 32
 <211> 11
 25 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDR3 VL F16
 <400> 32
 30 Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val Val
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 116
 <212> БЕЛОК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность домена VH F16
 <400> 33
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 40 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 45 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 5 Thr Val Ser Arg
 115
 <210> 34
 <211> 109
 <212> БЕЛОК
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность домена VL F16
 <400> 34
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 15 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 20 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro
 25 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105
 <210> 35
 <211> 235
 30 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность scFv(F16)
 <400> 35
 35 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 40 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 45 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

RU 2758 139 C2

Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser
 115 120 125
 Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val
 130 135 140
 5 Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp
 145 150 155 160
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys
 165 170 175
 Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
 10 180 185 190
 Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu
 195 200 205
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val Val
 210 215 220
 15 Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230 235
 <210> 36
 <211> 557
 <212> БЕЛОК
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант
 huTNF-альфа (R32A) [растворимая форма]
 <400> 36
 25 Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 30 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 35 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 40 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala
 130 135 140
 Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160
 45 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu
 165 170 175
 Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 180 185 190

RU 2758 139 C2

	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
	195	200	205
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
	210	215	220
5	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
	225	230	235
	Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
	245	250	255
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
10	260	265	270
	Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu		
	275	280	285
	Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln		
	290	295	300
15	Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
	305	310	315
	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile		
	325	330	335
	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
20	340	345	350
	Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln		
	355	360	365
	Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile		
	370	375	380
25	Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly		
	385	390	395
	Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val		
	405	410	415
	Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Ala		
30	420	425	430
	Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu		
	435	440	445
	Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe		
	450	455	460
35	Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile		
	465	470	475
	Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala		
	485	490	495
	Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys		
40	500	505	510
	Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys		
	515	520	525
	Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe		
	530	535	540
45	Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	545	550	555
	<210> 37		
	<211> 157		

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность растворимая форма внеклеточного
5 домена мутанта TNF-альфа (R32A) человека (huTNF-альфа R32A)

<400> 37

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val

1 5 10 15

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Ala
10 20 25 30Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 6015 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
85 90 95Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
20 100 105 110Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
115 120 125Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 14025 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 38

<211> 577

<212> БЕЛОК

30 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант
huTNF-альфа (R52A) (huTNF-альфа R52A) [внеклеточный домен]

<400> 38

35 Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
40 35 40 45Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys
50 55 60Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 8045 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

RU 2758 139 C2

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala
 130 135 140
 5 Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu
 165 170 175
 Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 10 180 185 190
 Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 195 200 205
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 210 215 220
 15 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 20 260 265 270
 Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
 275 280 285
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 290 295 300
 25 Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 305 310 315 320
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
 325 330 335
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 30 340 345 350
 Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 355 360 365
 Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 370 375 380
 35 Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
 385 390 395 400
 Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro
 405 410 415
 Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro
 40 420 425 430
 Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
 435 440 445
 Leu Asn Arg Ala Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg
 450 455 460
 45 Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
 465 470 475 480
 Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu
 485 490 495

Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn
 500 505 510
 Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly
 515 520 525
 5 Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe
 530 535 540
 Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
 545 550 555 560
 Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
 10 565 570 575
 Leu
 <210> 39
 <211> 177
 <212> БЕЛОК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность внеклеточного домена мутанта
 TNF-альфа (R52A) человека (huTNF-альфа R52A) [внеклеточный домен]
 <400> 39
 20 Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro
 1 5 10 15
 Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro
 20 25 30
 Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
 25 35 40 45
 Leu Asn Arg Ala Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg
 50 55 60
 Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
 65 70 75 80
 30 Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu
 85 90 95
 Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn
 100 105 110
 Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly
 35 115 120 125
 Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe
 130 135 140
 Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
 145 150 155 160
 40 Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
 165 170 175
 Leu
 <210> 40
 <211> 552
 45 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант

huTNF-альфа (R32A) [растворимая форма]

<400> 40

	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His	
1	5	10
5	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys	
	20	25
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys	
	35	40
10	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys	
	50	55
	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu	
	65	70
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu	
	85	90
15	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala	
	100	105
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile	
	115	120
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala	
20	130	135
	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	
	145	150
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg	
	165	170
25	Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp	
	180	185
	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser	
	195	200
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu	
30	210	215
	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
	225	230
	Cys Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu	
	245	250
35	Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser	
	260	265
	Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr	
	275	280
	Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser	
40	290	295
	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly	
	305	310
	Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser	
	325	330
45	Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp	
	340	345
	Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val	
	355	360
	365	

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser
 370 375 380
 Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Val Arg Ser Ser Ser
 385 390 395 400
 5 Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln
 405 410 415
 Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Ala Ala Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu
 10 435 440 445
 Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys
 450 455 460
 Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val
 465 470 475 480
 15 Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys
 485 490 495
 Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro
 500 505 510
 Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser
 20 515 520 525
 Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln
 530 535 540
 Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 545 550
 25 <210> 41
 <211> 572
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант
 huTNF-альфа (R52A) [внеклеточный домен]
 <400> 41
 Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 35 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys
 40 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 45 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125

RU 2758 139 C2

	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala			
	130	135	140	
	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
	145	150	155	160
5	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg			
	165	170	175	
	Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp			
	180	185	190	
	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser			
10	195	200	205	
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu			
	210	215	220	
	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
	225	230	235	240
15	Cys Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
	245	250	255	
	Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser			
	260	265	270	
	Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr			
20	275	280	285	
	Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser			
	290	295	300	
	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly			
	305	310	315	320
25	Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser			
	325	330	335	
	Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp			
	340	345	350	
	Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val			
30	355	360	365	
	Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser			
	370	375	380	
	Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly Pro Gln Arg Glu			
	385	390	395	400
35	Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val			
	405	410	415	
	Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val			
	420	425	430	
	Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Ala Ala			
40	435	440	445	
	Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val			
	450	455	460	
	Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys			
	465	470	475	480
45	Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser			
	485	490	495	
	Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile			
	500	505	510	

Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro
 515 520 525
 Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly
 530 535 540
 5 Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala
 545 550 555 560
 Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 565 570
 <210> 42
 10 <211> 553
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант
 15 huTNF-альфа (R32A) [растворимая форма]
 <400> 42
 Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 25 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 30 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala
 130 135 140
 35 Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
 165 170 175
 Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 40 180 185 190
 Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 195 200 205
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 210 215 220
 45 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 245 250 255

RU 2758139 C2

Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala
 260 265 270
 Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 275 280 285
 5 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser
 290 295 300
 Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
 305 310 315 320
 Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 10 325 330 335
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
 340 345 350
 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile
 355 360 365
 15 Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ser
 370 375 380
 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Val Arg Ser Ser
 385 390 395 400
 Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
 20 405 410 415
 Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Ala Ala Asn Ala Leu
 420 425 430
 Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
 435 440 445
 25 Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
 450 455 460
 Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
 465 470 475 480
 Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
 30 485 490 495
 Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
 500 505 510
 Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
 515 520 525
 35 Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
 530 535 540
 Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 545 550
 <210> 43
 40 <211> 573
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность мутанта huIL2-L19-huTNF-альфа
 45 (R52A) [внеклеточный домен]
 <400> 43
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

RU 2758139 C2

Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	
						20			25					30		
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	
						35			40					45		
5	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
						50			55					60		
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	
						65			70			75		80		
10	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
						85			90					95		
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	
						100			105					110		
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	
						115			120					125		
15	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Gly	Asp	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala
						130			135					140		
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
						145			150			155		160		
20	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser
						165			170					175		
Phe	Ser	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
						180			185					190		
Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	
						195			200					205		
25	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu
						210			215					220		
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
						225			230			235		240		
30	Cys	Ala	Lys	Pro	Phe	Pro	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
						245			250					255		
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Asp	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	
						260			265					270		
Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
						275			280					285		
35	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser
						290			295			300				
Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	
						305			310			315		320		
40	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe
						325			330					335		
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	
						340			345					350		
Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Gly	Arg	Ile	
						355			360					365		
45	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ser	Ser	Ser
						370			375			380				
Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	Gln	Arg	
						385			390			395		400		

RU 2758 139 C2

Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala
 405 410 415
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
 420 425 430
 5 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Ala
 435 440 445
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 450 455 460
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 10 465 470 475 480
 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 485 490 495
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 500 505 510
 15 Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 515 520 525
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 530 535 540
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 20 545 550 555 560
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 565 570
 <210> 44
 <211> 555
 25 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант
 huTNF-альфа (R32A) [растворимая форма]
 30 <400> 44
 Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 35 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 40 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 45 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

RU 2758 139 C2

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 145 150 155 160
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 165 170 175
 5 Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 180 185 190
 Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
 195 200 205
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 10 210 215 220
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 15 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly
 260 265 270
 Gly Ala Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
 275 280 285
 Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
 20 290 295 300
 Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 305 310 315 320
 Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp
 325 330 335
 25 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 340 345 350
 Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
 355 360 365
 Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
 30 370 375 380
 Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Val Arg
 385 390 395 400
 Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala
 405 410 415
 35 Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Ala Ala Asn
 420 425 430
 Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val
 435 440 445
 Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly
 40 450 455 460
 Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg
 465 470 475 480
 Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys
 485 490 495
 45 Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp
 500 505 510
 Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp
 515 520 525

Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu
 530 535 540
 Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 545 550 555

5 <210> 45
 <211> 575
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

10 <223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант
 huTNF-альфа (R52A) [внеклеточный домен]
 <400> 45

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1														
						5				10				15

15 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 20 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 25 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 30 130 135 140
 Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln
 145 150 155 160
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 165 170 175
 35 Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 180 185 190
 Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
 195 200 205
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 40 210 215 220
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 45 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly
 260 265 270
 Gly Ala Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
 275 280 285

RU 2758139 C2

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
 290 295 300
 Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 305 310 315 320
 5 Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp
 325 330 335
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 340 345 350
 Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
 10 355 360 365
 Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
 370 375 380
 Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Gly Pro
 385 390 395 400
 15 Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala
 405 410 415
 Gln Ala Val Arg Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala
 420 425 430
 His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn
 20 435 440 445
 Arg Ala Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn
 450 455 460
 Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val
 465 470 475 480
 25 Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His
 485 490 495
 Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu
 500 505 510
 Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu
 30 515 520 525
 Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu
 530 535 540
 Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu
 545 550 555 560
 35 Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 565 570 575
 <210> 46
 <211> 239
 <212> БЕЛОК
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность scFv (F16)
 <400> 46
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 45 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

	35	40	45
	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
5	65	70	75
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
	100	105	110
10	Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
	115	120	125
	Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu		
	130	135	140
	Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr		
15	145	150	155
	Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val		
	165	170	175
	Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
	180	185	190
20	Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln		
	195	200	205
	Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met		
	210	215	220
	Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
25	225	230	235
	<210> 47		
	<211> 556		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
30	<220>		
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF-альфа (R32A) [растворимая форма]		
	<400> 47		
	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
35	1	5	10
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
	20	25	30
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
	35	40	45
40	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys		
	50	55	60
	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
	65	70	75
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
45	85	90	95
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
	100	105	110
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		

RU 2758139 C2

	115	120	125
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp	Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Ala	
	130	135	140
	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly	Ley Val Gln Pro Gly	
5	145	150	155
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala	Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg	
	165	170	175
	Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly Ley Glu Trp	
	180	185	190
10	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly	Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser	
	195	200	205
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp	Asn Ser Lys Asn Thr Ley	
	210	215	220
	Tyr Ley Gln Met Asn Ser Ley Arg Ala	Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
15	225	230	235
	Cys Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ley	
	245	250	255
	Val Thr Val Ser Arg Gly Gly	Ser Gly Gly Gly Ser Gly	
	260	265	270
20	Gly Gly Gly Ser Ser Glu Ley Thr Gln Asp	Pro Ala Val Ser Val Ala	
	275	280	285
	Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp	Ser Ley Arg Ser	
	290	295	300
	Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys	Pro Gly Gln Ala Pro Val Ley	
25	305	310	315
	Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro	Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe	
	325	330	335
	Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser	Ley Thr Ile Thr Gly Ala	
	340	345	350
30	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp	Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr	
	355	360	365
	Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly	Thr Lys Ley Thr Val Ley Gly	
	370	375	380
	Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly	Ser Ser Ser Ser Gly Val	
35	385	390	395
	Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp	Lys Pro Val Ala His Val Val	
	405	410	415
	Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln	Ley Trp Ley Asn Arg Ala Ala	
	420	425	430
40	Asn Ala Ley Ley Ala Asn Gly Val	Glu Ley Arg Asp Asn Gln Ley Val	
	435	440	445
	Val Pro Ser Glu Gly Ley Tyr Ley Ile	Tyr Ser Gln Val Ley Phe Lys	
	450	455	460
	Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val	Ley Ley Thr His Thr Ile Ser	
45	465	470	475
	Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys	Val Asn Ley Ley Ser Ala Ile	
	485	490	495
	Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro	Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro	

	500	505	510
Trp	Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly		
	515	520	525
Asp	Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala		
5	530	535	540
Glu	Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	545	550	555
<210>	48		
<211>	576		
10	<212> БЕЛОК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<223>	Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF-альфа (R52A) [внеклеточный домен]		
15	<400> 48		
Ala	Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
1	5	10	15
Leu	Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
	20	25	30
20	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
	35	40	45
Lys	Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys		
	50	55	60
Pro	Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
25	65	70	75
Arg	Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
	85	90	95
Lys	Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
	100	105	110
30	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
	115	120	125
Ile	Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Ala		
	130	135	140
Ser	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
35	145	150	155
Gly	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg		
	165	170	175
Tyr	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
	180	185	190
40	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
	195	200	205
Val	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
	210	215	220
Tyr	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
45	225	230	235
Cys	Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
	245	250	255
Val	Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly		

RU 2758139 C2

	260	265	270
5	Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala 275	280	285
	Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser 290	295	300
	Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu 305	310	315
	Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe 325	330	335
10	Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala 340	345	350
	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr 355	360	365
	Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly 370	375	380
15	Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly 385	390	395
	Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu 405	410	415
20	Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val 420	425	430
	Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu 435	440	445
	Asn Arg Ala Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp 450	455	460
25	Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln 465	470	475
	Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr 485	490	495
30	His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu 500	505	510
	Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala 515	520	525
	Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln 530	535	540
35	Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr 545	550	555
	Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu 565	570	575
40	<210> 49		
	<211> 14		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
45	<223> Аминокислотная последовательность линкера, связывающего молекулу антитела и IL2 и/или мутант TNF		
	<400> 49		
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly		

1 5 10
 <210> 50
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность линкер, связывающего домен
 VH с доменом VL антитела
 <400> 50
 10 Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
 1 5 10
 <210> 51
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность линкера, связывающего домен
 VH с доменом VL антитела
 <400> 51
 20 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10
 <210> 52
 <211> 157
 <212> БЕЛОК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность растворимой формы внеклеточного
 домена мутанта TNF-альфа (R32W) человека (huTNF-альфа R32W)
 <400> 52
 30 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Trp
 20 25 30
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 35 40 45
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 40 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 100 105 110
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 45 115 120 125
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu

145 150 155
 <210> 53
 <211> 177
 <212> БЕЛОК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность внеклеточного домена мутанта
 TNF-альфа (R52W) человека (huTNF-альфа R52W)
 <400> 53
 10 Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro
 1 5 10 15
 Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro
 20 25 30
 Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
 15 35 40 45
 Leu Asn Arg Trp Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg
 50 55 60
 Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
 65 70 75 80
 20 Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu
 85 90 95
 Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn
 100 105 110
 Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly
 25 115 120 125
 Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe
 130 135 140
 Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
 145 150 155 160
 30 Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
 165 170 175
 Leu
 <210> 54
 <211> 157
 35 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность растворимой формы внеклеточного
 домена мутанта TNF-альфа (R32F) человека (huTNF-альфа R32F)
 40 <400> 54
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Phe
 20 25 30
 45 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 5 Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 100 105 110
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 115 120 125
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 10 130 135 140
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155
 <210> 55
 <211> 177
 15 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность внеклеточного домена мутанта
 TNF-альфа (R52F) человека (huTNF-альфа R52F)
 20 <400> 55
 Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro
 1 5 10 15
 Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro
 20 25 30
 25 Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
 35 40 45
 Leu Asn Arg Phe Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg
 50 55 60
 Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
 30 65 70 75 80
 Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu
 85 90 95
 Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn
 100 105 110
 35 Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly
 115 120 125
 Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe
 130 135 140
 Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
 40 145 150 155 160
 Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
 165 170 175
 Leu
 <210> 56
 45 <211> 157
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Аминокислотная последовательность растворимая форма внеклеточного домена мутанта TNF-альфа (R32V) человека (huTNF-альфа R32V)

<400> 56

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val

5 1 5 10 15

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Val

20 25 30

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu

35 40 45

10 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile

65 70 75 80

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
15 85 90 95

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

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
115 120 125

20 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 57

25 <211> 177

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность внеклеточного домена мутанта
30 TNF-альфа (R52V) человека (huTNF-альфа R52V)

<400> 57

Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro
1 5 10 15

Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro
35 20 25 30

Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
35 40 45

Leu Asn Arg Val Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg
50 55 60

40 Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
65 70 75 80

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

Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn
45 100 105 110

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

Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe

RU 2758139 C2

	130	135	140
	Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp		
145	150	155	160
	Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala		
5	165	170	175
	Leu		
	<210> 58		
	<211> 557		
	<212> БЕЛОК		
10	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF-альфа (R32W) [растворимая форма]		
	<400> 58		
15	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
	1	5	10
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
	20	25	30
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
20	35	40	45
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys		
	50	55	60
	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
	65	70	75
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
25	85	90	95
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
	100	105	110
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
30	115	120	125
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala		
	130	135	140
	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
	145	150	155
	160		
35	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu		
	165	170	175
	Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
	180	185	190
	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
40	195	200	205
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
	210	215	220
	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
	225	230	235
	240		
45	Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
	245	250	255
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	260	265	270

RU 2758139 C2

Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
 275 280 285
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 290 295 300
 5 Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 305 310 315 320
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
 325 330 335
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 10 340 345 350
 Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 355 360 365
 Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 370 375 380
 15 Lys Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
 385 390 395 400
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
 405 410 415
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Trp
 20 420 425 430
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 435 440 445
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 450 455 460
 25 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 465 470 475 480
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 485 490 495
 Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 30 500 505 510
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 515 520 525
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 530 535 540
 35 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 545 550 555
 <210> 59
 <211> 577
 <212> БЕЛОК
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант
 huTNF-альфа (R52W) (huTNF-альфа R52W) [внеклеточный домен]
 <400> 59
 45 Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

RU 2758 139 C2

	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys			
	35	40	45	
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys			
	50	55	60	
5	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu			
	65	70	75	80
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu			
	85	90	95	
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala			
10	100	105	110	
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile			
	115	120	125	
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala			
	130	135	140	
15	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
	145	150	155	160
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu			
	165	170	175	
	Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp			
20	180	185	190	
	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser			
	195	200	205	
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu			
	210	215	220	
25	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
	225	230	235	240
	Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	245	250	255	
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
30	260	265	270	
	Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu			
	275	280	285	
	Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln			
	290	295	300	
35	Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	305	310	315	320
	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile			
	325	330	335	
	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
40	340	345	350	
	Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	355	360	365	
	Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile			
	370	375	380	
45	Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly			
	385	390	395	400
	Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro			
	405	410	415	

RU 2758139 C2

Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro
 420 425 430
 Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
 435 440 445
 5 Leu Asn Arg Trp Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg
 450 455 460
 Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
 465 470 475 480
 Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu
 10 485 490 495
 Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn
 500 505 510
 Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly
 515 520 525
 15 Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe
 530 535 540
 Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
 545 550 555 560
 Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
 20 565 570 575
 Leu
 <210> 60
 <211> 557
 <212> БЕЛОК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант
 huTNF-альфа (R32F) [растворимая форма]
 <400> 60
 30 Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 40 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 45 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala
 130 135 140
 Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

RU 2758139 C2

	145	150	155	160
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu			
	165	170	175	
	Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp			
5	180	185	190	
	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser			
	195	200	205	
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu			
	210	215	220	
10	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
	225	230	235	240
	Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	245	250	255	
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
15	260	265	270	
	Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu			
	275	280	285	
	Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln			
	290	295	300	
20	Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	305	310	315	320
	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile			
	325	330	335	
	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
25	340	345	350	
	Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	355	360	365	
	Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile			
	370	375	380	
30	Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly			
	385	390	395	400
	Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val			
	405	410	415	
	Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Phe			
35	420	425	430	
	Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu			
	435	440	445	
	Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe			
	450	455	460	
40	Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile			
	465	470	475	480
	Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala			
	485	490	495	
	Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys			
45	500	505	510	
	Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys			
	515	520	525	
	Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe			

	530	535	540
	Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	545	550	555
	<210> 61		
5	<211> 577		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант		
10	huTNF-альфа (R52F) (huTNF-альфа R52F) [внеклеточный домен]		
	<400> 61		
	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
	1	5	10
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
15	20	25	30
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
	35	40	45
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys		
	50	55	60
20	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
	65	70	75
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
	85	90	95
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
25	100	105	110
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
	115	120	125
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala		
	130	135	140
30	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
	145	150	155
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu		
	165	170	175
	Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
35	180	185	190
	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
	195	200	205
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
	210	215	220
40	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
	225	230	235
	Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
	245	250	255
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
45	260	265	270
	Ser Gly Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu		
	275	280	285
	Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln		

RU 2758139 C2

	290	295	300
	Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
305	310	315	320
	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile		
5	325	330	335
	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
	340	345	350
	Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln		
	355	360	365
10	Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile		
	370	375	380
	Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly		
385	390	395	400
	Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro		
15	405	410	415
	Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro		
	420	425	430
	Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp		
	435	440	445
20	Leu Asn Arg Phe Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg		
	450	455	460
	Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser		
465	470	475	480
	Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu		
25	485	490	495
	Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn		
	500	505	510
	Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly		
	515	520	525
30	Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe		
	530	535	540
	Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp		
545	550	555	560
	Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala		
35	565	570	575
	Leu		
	<210> 62		
	<211> 557		
	<212> БЕЛОК		
40	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF-альфа (R32V) [растворимая форма]		
	<400> 62		
45	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
	1	5	10
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
	20	25	30

RU 2758 139 C2

	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met	Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met	Pro Lys
	35	40	45
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His	Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys	
	50	55	60
5	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn	Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His	Leu
	65	70	75
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val	Ile Val Leu Glu Leu	
	85	90	95
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met	Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala	
10	100	105	110
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp	Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile	
	115	120	125
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp	Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Ala	
	130	135	140
15	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly	Gly Leu Val Gln Pro Gly	
	145	150	155
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala	Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu	
	165	170	175
	Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp	
20	180	185	190
	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly	Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser	
	195	200	205
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn	Ser Lys Asn Thr Leu	
	210	215	220
25	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala	Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
	225	230	235
	Cys Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu	Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
	245	250	255
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly	Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
30	260	265	270
	Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser	Pro Gly Thr Leu	
	275	280	285
	Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala	Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln	
	290	295	300
35	Ser Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp	Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
	305	310	315
	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala	Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile	
	325	330	335
	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly	Ser Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
40	340	345	350
	Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala	Val Tyr Tyr Cys Gln Gln	
	355	360	365
	Met Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe	Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile	
	370	375	380
45	Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser	Gly Ser Ser Ser Ser Gly	
	385	390	395
	Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp	Lys Pro Val Ala His Val	
	405	410	415

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Val
 420 425 430
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 435 440 445
 5 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 450 455 460
 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 465 470 475 480
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 10 485 490 495
 Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 500 505 510
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 515 520 525
 15 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 530 535 540
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 545 550 555
 <210> 63
 20 <211> 577
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-мутант
 25 huTNF-альфа (R52V) (huTNF-альфа R52V) [внеклеточный домен]
 <400> 63
 Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 30 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 35 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 40 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala
 130 135 140
 45 Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu
 165 170 175

RU 2758 139 C2

Phe	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
					180					185				190		
Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	
					195					200				205		
5	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu
					210					215				220		
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
					225					230				235		
10	Cys	Ala	Lys	Ser	Thr	His	Leu	Tyr	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gly	
					245					250				255		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	
					260					265				270		
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	
					275					280				285		
15	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln
					290					295				300		
Ser	Val	Ser	Met	Pro	Phe	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	
					305					310				315		
20	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile
					325					330				335		
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	
					340					345				350		
Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	
					355					360				365		
25	Met	Arg	Gly	Arg	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
					370					375				380		
Lys	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	
					385					390				395		
30	Gly	Pro	Gln	Arg	Glu	Glu	Phe	Pro	Arg	Asp	Leu	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro
					405					410				415		
Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro		
					420					425				430		
Val	Ala	His	Val	Val	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	
					435					440				445		
35	Leu	Asn	Arg	Val	Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg
					450					455				460		
Asp	Asn	Gln	Leu	Val	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	
					465					470				475		
40	Gln	Val	Leu	Phe	Lys	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu
					485					490				495		
Thr	His	Thr	Ile	Ser	Arg	Ile	Ala	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Lys	Val	Asn	
					500					505				510		
Leu	Leu	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Pro	Cys	Gln	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	
					515					520				525		
45	Ala	Glu	Ala	Lys	Pro	Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe
					530					535				540		
Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	
					545					550				555		
															560	

Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
 565 570 575
 Leu
 <210> 64
 5 <211> 555
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант
 10 huTNF-альфа (R32W) [растворимая форма]
 <400> 64
 Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 15 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 20 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 25 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 30 Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln
 145 150 155 160
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 165 170 175
 Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 180 185 190
 Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
 195 200 205
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 210 215 220
 40 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly
 45 260 265 270
 Gly Ala Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
 275 280 285
 Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val

RU 2758139 C2

	290	295	300
	Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro		
305	310	315	320
	Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp		
5	325	330	335
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
	340	345	350
	Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly		
	355	360	365
10	Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser		
	370	375	380
	Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Val Arg		
385	390	395	400
	Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala		
15	405	410	415
	Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Trp Ala Asn		
	420	425	430
	Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val		
	435	440	445
20	Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly		
	450	455	460
	Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg		
465	470	475	480
	Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys		
25	485	490	495
	Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp		
	500	505	510
	Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp		
	515	520	525
30	Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu		
	530	535	540
	Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	545	550	555
	<210> 65		
35	<211> 575		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант		
40	huTNF-альфа (R52W) [внеклеточный домен]		
	<400> 65		
	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
1	5	10	15
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
45	20	25	30
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
	35	40	45
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys		

RU 2758139 C2

	50	55	60
	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
65	70	75	80
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
5	85	90	95
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
	100	105	110
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
	115	120	125
10	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly		
	130	135	140
	Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln		
145	150	155	160
	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
15	165	170	175
	Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
	180	185	190
	Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala		
	195	200	205
20	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
	210	215	220
	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
225	230	235	240
	Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
25	245	250	255
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly		
	260	265	270
	Gly Ala Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu		
	275	280	285
30	Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val		
	290	295	300
	Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro		
305	310	315	320
	Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp		
35	325	330	335
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
	340	345	350
	Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly		
	355	360	365
40	Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser		
	370	375	380
	Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Gly Pro		
385	390	395	400
	Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala		
45	405	410	415
	Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala		
	420	425	430
	His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn		

	435	440	445
	Arg Trp Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn		
	450	455	460
	Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val		
5	465	470	475
	Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His		
	485	490	495
	Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu		
	500	505	510
10	Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu		
	515	520	525
	Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu		
	530	535	540
	Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu		
15	545	550	555
	Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	565	570	575
	<210> 66		
	<211> 555		
20	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF-альфа (R32F) [растворимая форма]		
25	<400> 66		
	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
	1	5	10
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
	20	25	30
30	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
	35	40	45
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys		
	50	55	60
	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
35	65	70	75
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
	85	90	95
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
	100	105	110
40	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
	115	120	125
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly		
	130	135	140
	Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln		
45	145	150	155
	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
	165	170	175
	Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		

RU 2758139 C2

	180	185	190
10	Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala		
	195	200	205
5	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
	210	215	220
	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
	225	230	235
	Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		240
	245	250	255
10	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly		
	260	265	270
	Gly Ala Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu		
	275	280	285
15	Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val		
	290	295	300
	Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro		
	305	310	315
	Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp		320
	325	330	335
20	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
	340	345	350
	Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly		
	355	360	365
25	Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser		
	370	375	380
	Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Val Arg		
	385	390	395
	Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala		400
	405	410	415
30	Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Phe Ala Asn		
	420	425	430
	Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val		
	435	440	445
35	Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly		
	450	455	460
	Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg		
	465	470	475
	Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys		480
	485	490	495
40	Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp		
	500	505	510
	Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp		
	515	520	525
45	Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu		
	530	535	540
	Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	545	550	555

<211> 575
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант
 huTNF-альфа (R52F) [внеклеточный домен]
 <400> 67
 Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 10 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys
 15 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 20 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 25 130 135 140
 Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln
 145 150 155 160
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 165 170 175
 30 Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 180 185 190
 Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
 195 200 205
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 35 210 215 220
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 40 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly
 260 265 270
 Gly Ala Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
 275 280 285
 Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
 45 290 295 300
 Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 305 310 315 320
 Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp

RU 2758139 C2

	325	330	335
Arg	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
	340	345	350
5	Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly		
	355	360	365
Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser			
	370	375	380
Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly Pro			
	385	390	395
10	Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala		
	405	410	415
Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala			
	420	425	430
His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn			
	435	440	445
Arg Phe Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn			
	450	455	460
Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val			
	465	470	475
480	Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His		
	485	490	495
Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu			
	500	505	510
Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu			
	515	520	525
Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu			
	530	535	540
Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu			
	545	550	555
560	Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	565	570	575
<210>	68		
<211>	555		
<212>	БЕЛОК		
35	<213> Искусственная последовательность		
<220>			
<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант			
huTNF-альфа (R32V) [растворимая форма]			
<400>	68		
40	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
	1	5	10
15	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
	20	25	30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys			
	35	40	45
45	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys		
	50	55	60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu			

RU 2758 139 C2

	65	70	75	80
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu			
	85	90	95	
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala			
5	100	105	110	
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile			
	115	120	125	
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly			
	130	135	140	
10	Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln			
	145	150	155	160
	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe			
	165	170	175	
	Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
15	180	185	190	
	Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala			
	195	200	205	
	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn			
	210	215	220	
20	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val			
	225	230	235	240
	Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	245	250	255	
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Ser Gly			
25	260	265	270	
	Gly Ala Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu			
	275	280	285	
	Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val			
	290	295	300	
30	Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro			
	305	310	315	320
	Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp			
	325	330	335	
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
35	340	345	350	
	Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly			
	355	360	365	
	Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser			
	370	375	380	
40	Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Val Arg			
	385	390	395	400
	Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala			
	405	410	415	
	Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Val Ala Asn			
45	420	425	430	
	Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val			
	435	440	445	
	Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly			

	450	455	460
	Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg		
465	470	475	480
	Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys		
5	485	490	495
	Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp		
	500	505	510
	Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp		
	515	520	525
10	Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu		
	530	535	540
	Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	545	550	555
	<210> 69		
15	<211> 575		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант		
20	huTNF-альфа (R52V) [внеклеточный домен]		
	<400> 69		
	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
1	5	10	15
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
25	20	25	30
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
	35	40	45
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys		
	50	55	60
30	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
	65	70	75
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
	85	90	95
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
35	100	105	110
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
	115	120	125
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
	130	135	140
40	Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln		
	145	150	155
	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
	165	170	175
	Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
45	180	185	190
	Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala		
	195	200	205
	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		

	210	215	220
	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
225	230	235	240
	Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
5	245	250	255
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly		
	260	265	270
	Gly Ala Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu		
	275	280	285
10	Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val		
	290	295	300
	Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro		
305	310	315	320
	Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp		
15	325	330	335
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
	340	345	350
	Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly		
	355	360	365
20	Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser		
	370	375	380
	Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Gly Pro		
385	390	395	400
	Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala		
25	405	410	415
	Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala		
	420	425	430
	His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn		
	435	440	445
30	Arg Val Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn		
	450	455	460
	Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val		
465	470	475	480
	Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His		
35	485	490	495
	Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu		
	500	505	510
	Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu		
	515	520	525
40	Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu		
	530	535	540
	Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu		
545	550	555	560
	Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
45	565	570	575
	<210> 70		
	<211> 555		
	<212> БЕЛЮК		

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-huTNF-альфа [растворима]

<400> 70

5	Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His			
	1	5	10	15
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys			
	20	25	30	
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys			
10	35	40	45	
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys			
	50	55	60	
	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu			
	65	70	75	80
15	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu			
	85	90	95	
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala			
	100	105	110	
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile			
20	115	120	125	
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly			
	130	135	140	
	Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln			
	145	150	155	160
25	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe			
	165	170	175	
	Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
	180	185	190	
	Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala			
30	195	200	205	
	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn			
	210	215	220	
	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val			
	225	230	235	240
35	Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	245	250	255	
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly			
	260	265	270	
	Gly Ala Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu			
40	275	280	285	
	Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val			
	290	295	300	
	Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro			
	305	310	315	320
45	Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp			
	325	330	335	
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
	340	345	350	

RU 2758139 C2

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly
 355 360 365

Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
 370 375 380

5 Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Val Arg
 385 390 395 400

Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala
 405 410 415

Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn
 10 420 425 430

Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val
 435 440 445

Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly
 450 455 460

15 Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg
 465 470 475 480

Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys
 485 490 495

Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp
 20 500 505 510

Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp
 515 520 525

Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu
 530 535 540

25 Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 545 550 555

<210> 71

<211> 575

<212> БЕЛОК

30 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-huTNF-альфа [внеклеточн

<400> 71

Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 35 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

40 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 45 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

RU 2758 139 C2

	115	120	125
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
	130	135	140
	Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln		
5	145	150	155
	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
	165	170	175
	Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
	180	185	190
10	Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala		
	195	200	205
	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
	210	215	220
	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
15	225	230	235
	Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
	245	250	255
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly		
	260	265	270
20	Gly Ala Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu		
	275	280	285
	Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val		
	290	295	300
	Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro		
25	305	310	315
	Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp		
	325	330	335
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
	340	345	350
30	Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly		
	355	360	365
	Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser		
	370	375	380
	Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Gly Pro		
35	385	390	395
	Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala		
	405	410	415
	Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala		
	420	425	430
40	His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn		
	435	440	445
	Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn		
	450	455	460
	Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val		
45	465	470	475
	Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His		
	485	490	495
	Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu		

RU 2758139 C2

	500	505	510
	Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu		
	515	520	525
	Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu		
5	530	535	540
	Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu		
	545	550	555
	Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	565	570	575
10	<210> 72		
	<211> 556		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
15	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF-альфа (R32W) [растворимая форма]		
	<400> 72		
	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
	1	5	10
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
20	20	25	30
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
	35	40	45
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys		
25	50	55	60
	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
	65	70	75
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
	85	90	95
30	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
	100	105	110
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
	115	120	125
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Ala		
35	130	135	140
	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
	145	150	155
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg		
	165	170	175
40	Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
	180	185	190
	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
	195	200	205
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
45	210	215	220
	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
	225	230	235
	Cys Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		240

	245	250	255
5	Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
	260	265	270
	Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala		
	275	280	285
	Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser		
	290	295	300
	Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu		
	305	310	315
10	320		
	Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe		
	325	330	335
	Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala		
	340	345	350
	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr		
15	355	360	365
	Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
	370	375	380
	Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Val		
	385	390	395
			400
20	Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val		
	405	410	415
	Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Trp Ala		
	420	425	430
	Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val		
25	435	440	445
	Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys		
	450	455	460
	Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser		
	465	470	475
			480
30	Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile		
	485	490	495
	Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro		
	500	505	510
	Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly		
35	515	520	525
	Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala		
	530	535	540
	Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	545	550	555
40	<210> 73		
	<211> 576		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
45	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF-альфа (R52W) [внеклеточный домен]		
	<400> 73		
	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		

RU 2758 139 C2

1	5	10	15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys			
20	25	30	
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys			
5	35	40	45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys			
50	55	60	
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu			
65	70	75	80
10	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
	85	90	95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala			
	100	105	110
15	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
	115	120	125
Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala			
	130	135	140
Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
145	150	155	160
20	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg		
	165	170	175
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp			
	180	185	190
Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser			
25	195	200	205
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu			
	210	215	220
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
225	230	235	240
30	Cys Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
	245	250	255
Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly			
	260	265	270
Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala			
35	275	280	285
Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser			
	290	295	300
Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu			
305	310	315	320
40	Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe		
	325	330	335
Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala			
	340	345	350
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr			
45	355	360	365
Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
	370	375	380
Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Gly			

RU 2758139 C2

	385	390	395	400
	Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu			
	405	410	415	
5	Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val			
	420	425	430	
	Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu			
	435	440	445	
	Asn Arg Trp Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp			
	450	455	460	
10	Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln			
	465	470	475	480
	Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr			
	485	490	495	
	His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu			
15	500	505	510	
	Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala			
	515	520	525	
	Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln			
	530	535	540	
20	Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr			
	545	550	555	560
	Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu			
	565	570	575	
	<210> 74			
25	<211> 556			
	<212> БЕЛОК			
	<213> Искусственная последовательность			
	<220>			
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант			
30	huTNF-альфа (R32F) [растворимая форма]			
	<400> 74			
	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His			
	1	5	10	15
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys			
35	20	25	30	
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys			
	35	40	45	
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys			
	50	55	60	
40	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu			
	65	70	75	80
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu			
	85	90	95	
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala			
45	100	105	110	
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile			
	115	120	125	
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Ala			

RU 2758139 C2

	130	135	140
	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly	Gly Leu Val Gln Pro Gly	
145	150	155	160
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala	Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg	
5	165	170	175
	Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp	
	180	185	190
	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
	195	200	205
10	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
	210	215	220
	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
225	230	235	240
	Cys Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
15	245	250	255
	Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly		
	260	265	270
	Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala		
	275	280	285
20	Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser		
	290	295	300
	Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu		
305	310	315	320
	Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe		
25	325	330	335
	Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala		
	340	345	350
	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr		
	355	360	365
30	Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
	370	375	380
	Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Val		
385	390	395	400
	Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val		
35	405	410	415
	Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Phe Ala		
	420	425	430
	Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val		
	435	440	445
40	Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys		
	450	455	460
	Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser		
465	470	475	480
	Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile		
45	485	490	495
	Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro		
	500	505	510
	Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly		

	515	520	525
	Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala		
	530	535	540
	Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
5	545	550	555
	<210> 75		
	<211> 576		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
10	<220>		
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF-альфа (R52F) [внеклеточный домен]		
	<400> 75		
	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
15	1	5	10
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
	20	25	30
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
	35	40	45
20	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys		
	50	55	60
	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
	65	70	75
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
25	85	90	95
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
	100	105	110
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
	115	120	125
30	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Ala		
	130	135	140
	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
	145	150	155
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg		
35	165	170	175
	Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
	180	185	190
	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
	195	200	205
40	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
	210	215	220
	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
	225	230	235
	Cys Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
45	245	250	255
	Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
	260	265	270
	Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala		

RU 2758139 C2

	275	280	285
10	Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser		
	290	295	300
5	Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu		
	305	310	315
10	Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe		
	325	330	335
15	Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala		
	340	345	350
20	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr		
	355	360	365
25	Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
	370	375	380
30	Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly		
	385	390	395
35	Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu		
	405	410	415
40	Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val		
	420	425	430
45	Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu		
	435	440	445
50	Asn Arg Phe Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp		
	450	455	460
55	Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln		
	465	470	475
60	Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr		
	485	490	495
65	His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu		
	500	505	510
70	Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala		
	515	520	525
75	Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln		
	530	535	540
80	Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr		
	545	550	555
85	Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	565	570	575
90	<210> 76		
	<211> 556		
95	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
100	<220>		
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF-альфа (R32V) [растворимая форма]		
105	<400> 76		
	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
	1	5	10
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		15

RU 2758139 C2

	20	25	30
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
	35	40	45
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys		
5	50	55	60
	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
	65	70	75
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
	85	90	95
10	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
	100	105	110
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
	115	120	125
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala		
15	130	135	140
	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
	145	150	155
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg		
	165	170	175
20	Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
	180	185	190
	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
	195	200	205
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
25	210	215	220
	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
	225	230	235
	Cys Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
	245	250	255
30	Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
	260	265	270
	Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala		
	275	280	285
	Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser		
35	290	295	300
	Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu		
	305	310	315
	Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe		
	325	330	335
40	Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala		
	340	345	350
	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr		
	355	360	365
	Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
45	370	375	380
	Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Val		
	385	390	395
	Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val		400

	405	410	415
5	Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Val Ala		
	420	425	430
	Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val		
	435	440	445
	Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys		
	450	455	460
	Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser		
	465	470	475
10	Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile		
	485	490	495
	Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro		
	500	505	510
	Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly		
15	515	520	525
	Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala		
	530	535	540
	Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
	545	550	555
20	<210> 77		
	<211> 576		
	<212> БЕЛОК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
25	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант huTNF-альфа (R52V) [внеклеточный домен]		
	<400> 77		
	Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
	1	5	10
30	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
	20	25	30
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
	35	40	45
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys		
35	50	55	60
	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
	65	70	75
	80		
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
	85	90	95
40	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
	100	105	110
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
	115	120	125
	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Ala		
45	130	135	140
	Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
	145	150	155
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg		160

RU 2758139 C2

	165	170	175
5	Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
	180	185	190
	Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
	195	200	205
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
	210	215	220
	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
	225	230	235
10	Cys Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
	245	250	255
	Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
	260	265	270
	Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala		
15	275	280	285
	Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser		
	290	295	300
	Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu		
	305	310	315
20	Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe		
	325	330	335
	Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala		
	340	345	350
	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr		
25	355	360	365
	Met Pro Pro Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
	370	375	380
	Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly		
	385	390	395
30	Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu		
	405	410	415
	Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val		
	420	425	430
	Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu		
35	435	440	445
	Asn Arg Val Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp		
	450	455	460
	Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln		
	465	470	475
40	Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr		
	485	490	495
	His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu		
	500	505	510
	Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala		
45	515	520	525
	Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln		
	530	535	540
	Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr		

545	550	555	560
Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu			
565		570	
			575

5 (57) Формула изобретения

1. Слитый белок для лечения злокачественной опухоли, содержащий интерлейкин-2 (IL2), мутант фактора некроза опухоли (TNF α) человека и молекулу антитела, которая связывает фибронектин,

где последовательность IL2 имеет по меньшей мере 90% идентичность

10 аминокислотной последовательности IL2, указанной в SEQ ID NO: 12;

где мутант TNF α человека имеет сниженную активность относительно TNF α человека дикого типа и содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17 с заменой R в положении, соответствующем R32 SEQ ID NO: 15 или R52 SEQ ID NO: 17, на A, F 15 или V;

где молекула антитела представляет собой одноцепочечный Fv (scFv) или диантитело и содержит антигенсвязывающий центр, имеющий определяющие комплементарность области (CDR) антитела F8, указанные в SEQ ID NO 6-11, или содержит антигенсвязывающий центр, имеющий определяющие комплементарность области 20 (CDR) L19, указанные в SEQ ID NO 18-23.

2. Слитый белок по п.1, где мутант TNF α человека имеет мутацию R на A в указанном положении.

3. Слитый белок по п.1, где TNF α человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 39.

25 4. Слитый белок по п.1, где антитело связывает экстрадомен-А (ED-A) фибронектина и

(i) молекула антитела содержит антигенсвязывающий центр, имеющий определяющие комплементарность области (CDR) антитела F8, указанные в SEQ ID NO: 6-11,

30 (ii) молекула антитела содержит домены VH и VL антитела F8, указанные в SEQ ID NO: 2 и 4; и/или

(iii) где молекула антитела содержит аминокислотную последовательность scFv F8, указанную в SEQ ID NO: 5.

5. Слитый белок по п.1, где антиело связывает экстрадомен-В (ED-B) фибронектина и

35 (i) молекула антитела содержит антигенсвязывающий центр, имеющий определяющие комплементарность области (CDR) антитела L19, указанные в SEQ ID NO: 18-23,

(ii) молекула антитела содержит домены VH и VL антитела L19, указанные в SEQ ID NO: 24 и 25, и/или

40 (iii) молекула антитела содержит аминокислотную последовательность scFv L19, указанную в SEQ ID NO: 26.

6. Слитый белок по любому из пп.1-5, где молекула антитела представляет собой одноцепочечный Fv (scFv).

7. Слитый белок по п.6, где

45 (i) IL2 связан с N-концом домена VH scFv через пептидный линкер и мутант TNF связан с C-концом домена VL scFv через пептидный линкер,

(ii) мутант TNF связан с N-концом домена VH scFv через пептидный линкер и IL2 связан с C-концом домена VL scFv через пептидный линкер, или

(iii) IL2 и мутант TNF связаны с C-концом домена VL scFv через пептидный линкер

или IL2 и TNF α связаны с N-концом scFv через пептидный линкер;
и где последовательность пептидного линкера имеет по меньшей мере 90%
идентичность аминокислотной последовательности, указанной в одной из SEQ ID NO:
13, 14 или 49.

- 5 8. Слитый белок по п.4, где
 (i) слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 с
мутацией R на A в положении 432 или аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 16 с мутацией R на A в положении 452 или
 (ii) слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или
 10 SEQ ID NO: 38.

9. Слитый белок по п. 5, где
 (i) слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 с
мутацией R на A в положении 430 или аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 71 с мутацией R на A в положении 450, или
 15 (ii) слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42,
SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 45.

10. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок по любому из пп.1-9.

11. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую
 20 слитый белок по любому из пп.1-9.

12. Способ лечения злокачественной опухоли путем нацеливания IL2 и TNF на
новообразованные сосуды *in vivo*, включающий введение слитого белка пациенту;
где слитый белок содержит интерлейкин-2 (IL2), мутант фактора некроза опухоли
(TNF α) человека и молекулу антитела, которая связывает фибронектин,

- 25 где последовательность IL2 имеет по меньшей мере 90% идентичность
аминокислотной последовательности IL2, указанной в SEQ ID NO: 12;

где мутант TNF α человека имеет сниженную активность относительно TNF α человека
дикого типа и имеет по меньшей мере 90% идентичность аминокислотной
последовательности SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17 с заменой R в положении,

- 30 соответствующем R32 SEQ ID NO: 15 или R52 SEQ ID NO: 17, на A, F или V; и
где молекула антитела содержит антигенсвязывающий центр, имеющий определяющие
комплементарность области (CDR) антитела F8, указанные в SEQ ID NO 6-11, или
содержит антигенсвязывающий центр, имеющий определяющие комплементарность
области (CDR) L19, указанные в SEQ ID NO 18-23.

- 35 13. Способ по п. 12, где злокачественная опухоль представляет собой меланому, рак
головы и шеи, рак почки или саркому.

14. Способ доставки IL2 и TNF в новообразованные сосуды опухоли у пациента,
включающий введение слитого белка пациенту;

- где слитый белок содержит интерлейкин-2 (IL2), мутант фактора некроза опухоли
 40 (TNF α) человека и молекулу антитела, которая связывает фибронектин,

где последовательность IL2 имеет по меньшей мере 90% идентичность
аминокислотной последовательности IL2, указанной в SEQ ID NO: 12;

- 45 где мутант TNF α человека имеет сниженную активность относительно TNF α человека
дикого типа и имеет по меньшей мере 90% идентичность аминокислотной
последовательности SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17 с заменой R в положении,

соответствующем R32 SEQ ID NO: 15 или R52 SEQ ID NO: 17, на A, F или V; и
где молекула антитела содержит антигенсвязывающий центр, имеющий определяющие
комплементарность области (CDR) антитела F8, указанные в SEQ ID NO 6-11, или

содержит антигенсвязывающий центр, имеющий определяющие комплементарность области (CDR) L19, указанные в SEQ ID NO 18-23.

15. Способ по п. 14, где опухоль является результатом меланомы, рака головы и шеи, рака почки или саркомы.

5

10

15

20

25

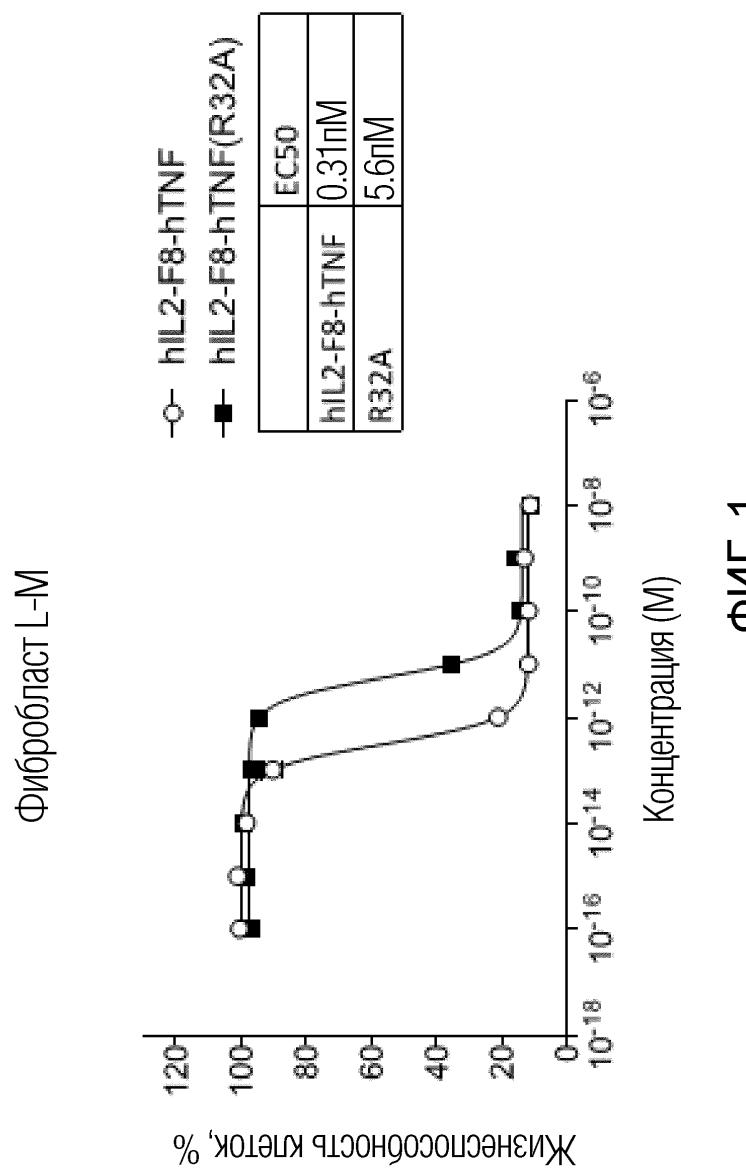
30

35

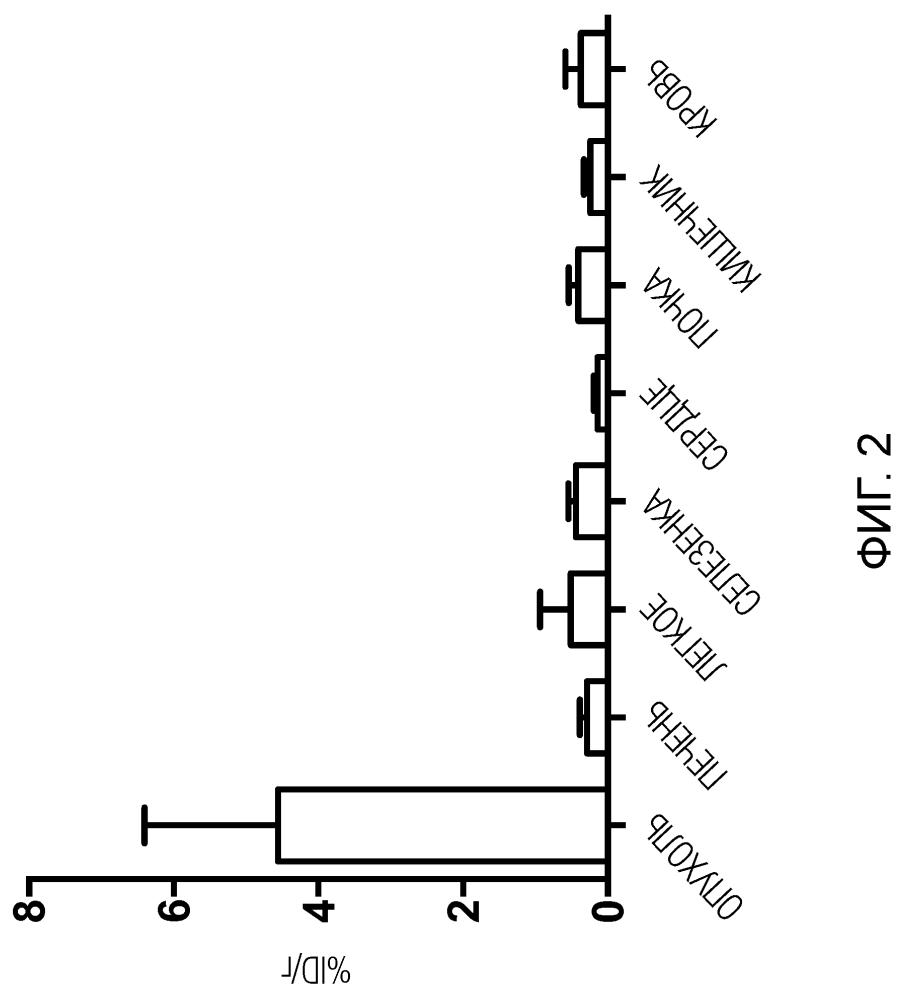
40

45

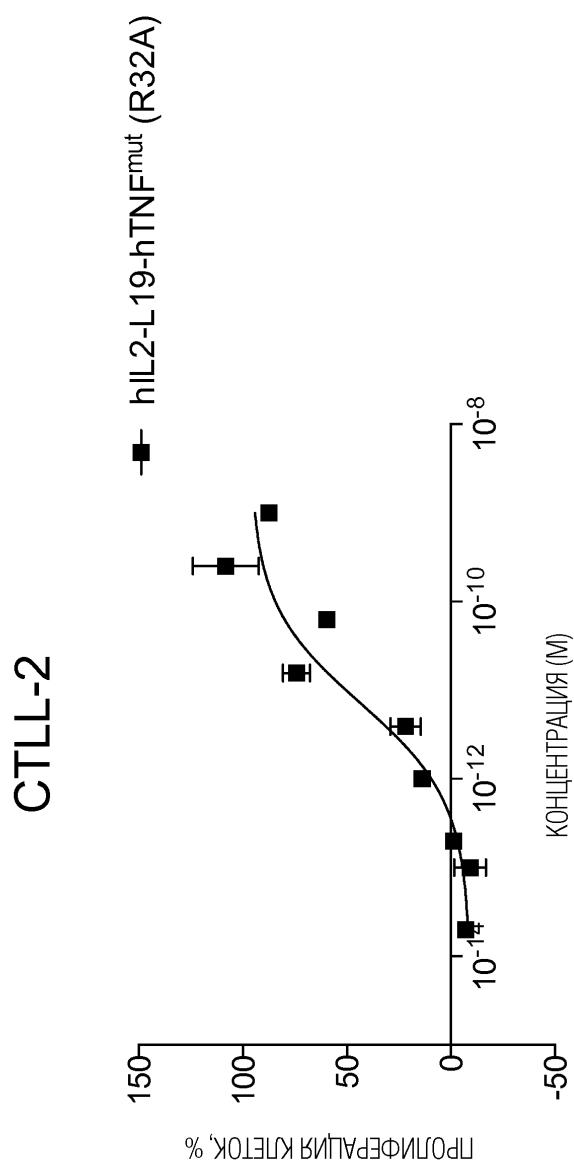
1/5



2/5

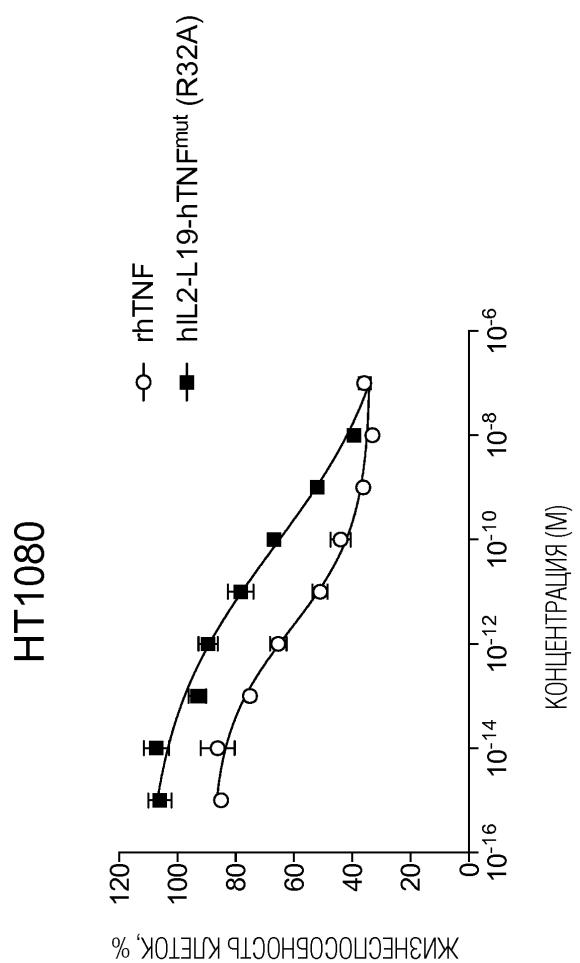


3/5



ФИГ. 3

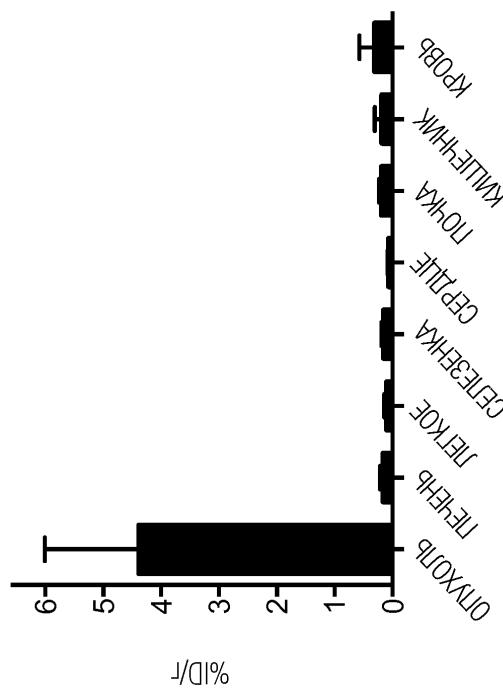
4/5



ФИГ. 4

5/5

БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ У МЫШЕЙ 129SV, ИМЕЮЩИХ ОПУХОЛИ F9

hIL2-L19-hTNF^{mut} (R32A), 24ч

n = 3
СТЕПЕНЬ НАКОПЛЕНИЯ: 18.7%
ИНЪЕЦИРОВАННАЯ ДОЗА: 10 мкг/мышь

ФИГ. 5