



(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) ИММУНОКОНЬЮГАТЫ 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.

(56) (продолжение):

fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor alpha, CANCER RESEARCH, 2003, v. 63, n. 12, p.3202 - 3210; RU 2363707 C2,10.08.2009; 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.

RU 2758139 C2

RU 2758139 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(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:
08.11.2017Registration 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 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 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-2а [IFN α 2a]), интрон А1 (IFN α 2b), беромун 1 (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.

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 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 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 (Eigentler 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; 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 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 комбинаций иммуноцитоклинов 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 иммуноцитоклинов используются в терапии.

Например, конъюгаты L19-IL2 и L19-TNF α были способны излечить нейробластому в модели заболевания на полностью сингенных мышах, в то время отдельные иммуноцитоклины, используемые в качестве единственных средств, не приводили к устранению заболевания (Balza et al., 2010, *Int. J. Cancer*, 127, 101). Комбинация грузов IL2 и TNF α также продемонстрировала перспективные результаты в клинических 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 IIIС (Danielli et al., 2015, *Cancer Immunol. Immunother.* 64, 113-121), и 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., 2012, *Angiogenesis* 15, 165-169).

Также были предприняты попытки получить "двойные иммуноцитоклины", 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. 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 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 иммуноцитоклинов *in vivo* является чрезвычайно непредсказуемым.

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/гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (IL4/GM-CSF). Активность цитокинов была сохранена в конструкциях, в которых цитокины были слиты тандемно с С-концом Fc или тяжелой (H) цепи антитела, а также в конструкциях, в которых один цитокин был слит с С-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-цитоклин

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.

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.

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.

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 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 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 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 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 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 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 меченного 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 минииммуноглобулине или малом иммунопротеине (SIP), например, как описано в (Li et al., (1997), Protein Engineering, 10: 731-736). SIP может содержать молекулу scFv, слитую 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 минииммуноглобулина. 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 С-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 антиидиотипической 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 TNF α и молекулу антитела, которая связывает экстрадомен A (ED-A) фибронектина, демонстрирует сниженную токсичность по сравнению с конъюгатом, содержащим IL2; TNF α и молекулу антитела, которая связывает экстрадомен A (ED-A) фибронектина. Более того, авторы настоящего изобретения также показали, что конъюгат, содержащий IL2; мутантный TNF α и молекулу антитела, которая связывает изоформу экстрадомена B (ED-B) фибронектина, демонстрирует сниженную токсичность по сравнению с рекомбинантным TNF α . Другие конъюгаты, содержащие IL2 и мутантный TNF, предпочтительно TNF α , 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, уменьшаемые 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 эффект части, представляющей собой IL2, которую можно вводить в более высокой

10 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 мутантный TNF α , и молекулу антитела, которая связывает экстрадомен A (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 TNF α , и молекулу антитела, которая связывает экстрадомен B (ED-B) фибронектина, может успешно нацеливаться на новообразованные сосуды

15 опухоли *in vivo*. Другие конъюгаты, содержащие IL2 и мутантный TNF, предпочтительно TNF α , 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

20 конъюгат, содержащий IL2; TNF α и молекулу антитела, которая связывает экстрадомен A (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 антигена 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 A (ED-A) фибронектина (A-FN), изоформу экстрадомена B (ED-B) фибронектина (B-FN), тенасцин C, ED-A фибронектина, ED-B фибронектина или домен A1 тенасцина C. Антитела, которые связывают ED-A фибронектина, и таким образом, также A-FN, известны в

35 данной области и включают антитело F8. Антитела, которые связывают ED-B фибронектина, или домен A1 тенасцина C (и, таким образом, также B-FN и тенасцин C), 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 C, включая антитела L19 и F16, способны к специфическому нацеливанию на новообразованные сосуды опухоли *in vivo*. Таким образом, конъюгат, описанный в настоящем описании, содержащий IL2, мутант TNF, предпочтительно TNF α , и молекулу

40 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 CEA (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 мембраносвязанного 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, CEA, 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 паратопом, 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 эпитопом. Антигенсвязывающий центр антитела может быть предоставлен посредством одного или нескольких переменных доменов антитела. Предпочтительно антигенсвязывающий центр содержит переменную область легкой цепи (VL) антитела и переменную область тяжелой цепи (VH) антитела.

Антигенсвязывающий центр может быть предоставлен посредством компоновки 15 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 переменных доменов VH и VL антитела, кодируемых реарранжированными генами 20 иммуноглобулинов. Структуры и положение переменных доменов иммуноглобулинов 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).

25 Под областью CDR, или CDR, подразумевают гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина 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 30 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 35 антитела с антигеном или эпитопом, который оно распознает.

Среди шести коротких последовательностей CDR третья CDR тяжелой цепи (HCDR3) имеет более высокую переменность 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. 40 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).

45 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 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, 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, кодирующей вариабельную область иммуноглобулина или CDR молекулы антитела, 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, продуцирующую антитело, также можно подвергать генетической мутации или другим изменениям, которые могут изменять или могут не изменять специфичность

продуцированных 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 общеизвестный 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, 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).

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.

Моноклональные антитела можно получать, например, из клетки животного, иммунизированного против антигена, ассоциированного с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, такого как A-FN, B-FN, тенаascin C, ED-A фибронектина, ED-B фибронектина или домен A1 тенаасина C, в соответствии с обычными способами, посредством генетической рекомбинации, начинающейся с последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в последовательности кДНК, кодирующей A-FN, B-FN или тенаascin C, или их фрагмент, или посредством пептидного синтеза, начинающегося с последовательности аминокислот, содержащейся в пептидной последовательности A-FN, B-FN или тенаасина 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.

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 А1 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 А1 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 после достижения стадии экспоненциального роста несколько миллиардов их распределяют на подложку для роста, состоящую из подходящим образом предварительно обработанного мембранного фильтра, который инкубируют до тех пор, пока не появляются полностью смыкающиеся колонии бактерий. Вторая подложка-ловушка состоит из другого мембранного фильтра, предварительно увлажненного и покрытого требуемым антигеном.

Затем мембрану-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 возможной достижение экспрессии генов, кодирующих фрагменты антител, такие как scFv, обладающие распространяющимся действием, так чтобы эти фрагменты, специфически связывающиеся с антигеном, который присутствует на мембране-ловушке, улавливались. Затем мембрану-ловушку можно обрабатывать для идентификации связанных фрагментов антител, таких как scFv, например, с использованием 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 мембране 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 мембране-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 WO02/46455.

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 переменный 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 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, 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 A1 тенасцина С или другой антиген-мишень или изоформа, можно далее тестировать, например, в отношении способности конкурировать с антителом, специфичным к A-FN, B-FN, ED-A или ED-B фибронектина, тенасцину С или домену A1 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 и/или VL для получения мутаций по всему вариабельному домену. В некоторых вариантах осуществления одну или две аминокислотных 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 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 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 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 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 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 А1 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 А1 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 варибельного 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 варибельного домена могут представлять собой остатки, которые в норме не ассоциированы со встречающимися в природе областями варибельных доменов. Например, конструкция молекул антител по настоящему изобретению, полученных способами рекомбинантных ДНК, может обеспечивать внесение N- или С-концевых остатков, кодируемых линкерами, внесенными для облегчения клонирования или других стадий манипулирования. Другие стадии манипулирования включают внесение линкеров для связывания варибельных доменов, описанных в настоящем описании, с другими белковыми последовательностями, включая константные области антител, другие варибельные 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 А1 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 H), 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 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 специалистами в данной области, или также посредством пептидного синтеза с использованием, 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 TNF α , и молекулу антитела, которая связывает антиген, ассоциированный с неопластическим ростом и/или ангиогенезом, как описано в 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 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 фактор некроза опухоли представляет собой TNF α , TNF α предпочтительно представляет собой TNF α 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 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 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, 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 системе и присутствие A в этом положении приводит к неожиданно высоким выходам в рекомбинантной системе.

TNF α человека состоит из цитоплазматического домена из 35 аминокислот, трансмембранного 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 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%, 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 положении, соответствующем положению 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 последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 17, с одной или несколькими мутациями, которые снижают активность, например, мутацией в положении, соответствующем положению 52 в SEQ ID NO: 17.

Авторы изобретения показали, что конъюгат по настоящему изобретению, и в частности, TNF α , присутствующий в конъюгате по настоящему изобретению, где остаток 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. 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 последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 37, с А в положении, соответствующем положению 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 последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 39, с А в положении, соответствующем положению 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 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 аспарагиновую 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" подразумевают 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
 25 мутант TNF α , могут быть ковалентно связаны, например, пептидными связями (амидные 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/или ангиогенезом, 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 А. Например, конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 36, может содержать остаток А 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 А в положении 432 или SEQ ID NO: 16 с мутацией R на А 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 А и остаток в положении, соответствующем положению 452 в варианте SEQ ID NO: 16, представляет собой А. Например, конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 16, может содержать остаток А 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%, 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, 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%, 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. 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 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 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. 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 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, конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 42, может содержать остаток А в положении 428.

Альтернативно конъюгаты, 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, конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 43, может содержать остаток А в положении 448.

Альтернативно конъюгаты, 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 конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 44, может содержать остаток А в положении 430.

Альтернативно конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45, или могут
представлять собой ее вариант. Вариант может обладать по меньшей мере 70%, более
25 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, конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 45, может содержать
30 остаток А в положении 450.

Альтернативно конъюгаты, описанные в настоящем описании, могут содержать или состоять из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 70 с мутацией R на А в положении 430 или SEQ ID NO: 71 с мутацией R на А 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, конъюгат, который представляет собой вариант SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71, может содержать остаток А в положении 430 или 450 соответственно.

Альтернативно конъюгаты, 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
45 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, 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 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 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 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 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 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 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).

Это может быть преимущественным, поскольку иммуноцитокнины на основе IL2 обычно используют в клинике в более высоких дозах по сравнению с иммуноцитокнинами 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 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 U заменен на Т, если контекст не требует иного.

Кроме того, предусматриваются конструкции в форме плазмид, векторов (например, 10 экспрессирующих векторов), кассет транскрипции или экспрессирующих 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 15 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 20 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.

30 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 35 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.

Системы для клонирования и экспрессии полипептида в множестве различных клеток-хозяев хорошо известны. Экспрессия антител, включая их конъюгаты, в 40 прокариотических клетках является общеизвестной в данной области. Для обзора см., например, Plückthun (1991), *Bio/Technology* 9: 545-551. Обычным бактериальным хозяином является *E.coli*.

Экспрессия в эукариотических клетках в культуре также доступна специалистам в данной области в качестве возможности продуцирования конъюгатов, например, Chadd 45 et al. (2001), *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188-194; Andersen et al. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117; Larrick & 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 (CHO), 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, 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, опосредуемую липосомами трансфекцию и трансдукцию с использованием ретровируса или другого вируса, например, вируса коровьей оспы, или, для клеток насекомых, бакуловируса. Для введения нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, в частности, эукариотическую клетку можно использовать вирусную систему или систему на основе плазмиды. 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 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, 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 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 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), 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 терапии. Конкретные конъюгаты могут быть гликозилированными, либо естественным образом, либо посредством систем гетерологичных эукариотических клеток (например, клетки CHO 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 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 A). Молекула антитела может связывать ED-B (экстрадомен B).

Экстрадомен-A (EDA или ED-A) фибронектина также известен как ED, экстраповтор A типа III (EPIA) или EDI. Последовательность ED-A человека опубликована Kornblihtt et al. (1984), *Nucleic Acids Res.* 12, 5853-5868 и Paoletta et al. (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 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-A (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 A фибронектина человека.

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

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 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 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 A1 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 несолитной 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 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 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, внутриопухолевую или подкожную. Предпочтительно, конъюгат по настоящему изобретению вводят

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

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 конъюгата huIL2-F8-huTNF α , конъюгатов huIL2-F8-мутант huTNF α , конъюгата huIL2-L19-huTNF α и конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α .

Различные конъюгаты 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 иммуноцитоклинов IL2-L19-TNF α или IL2-F8-TNF α . Выход мутанта R32A был неожиданно высоким для обоих иммуноцитоклинов.

	Белок	Мутация	Буфер для диализа	Выход (мг/л)	Профиль FPLC	SDS-PAGE	MS	SEQ ID NO
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
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 конъюгата на активность уничтожения клеток

Слитые белки смогли экспрессировать и очистить до однородного состояния.

Очищенный конъюгат huIL2-F8-huTNF α (SEQ ID NO: 1) и конъюгат 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 конъюгате 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 конъюгатах. 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 конъюгата huIL2-F8-мутант huTNF α (R32A) была более низкой по сравнению с конъюгатом 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/г). 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 А 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 меченного 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/ \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 .

APTSSSTKKTKLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTA
VYYCAKSTHLYLFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGER

ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPVAN
VVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPST
HVLTLTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRL
5 SAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIL

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

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLY
TVSS

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

GGGGSGGGSGGGG

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

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATG
15 IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIK

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

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLY
TVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQK
20 GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQ
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
30 NO: 12)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLT

8. Аминокислотная последовательность линкера, связывающего молекулу антитела
35 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

10. Аминокислотная последовательность растворимой формы внеклеточного домена
TNF α человека (huTNF α) (SEQ ID NO: 15)

VRSSSRTPSDKPVANVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLY
LIYSQVLFKGGQCPSTHVLTLTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYE
PIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIL

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

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-huTNF α [внеклеточный
домен] (IL2 человека - линкер- VH F8- линкер - VL F8 - линкер - TNF α человека

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

APTSSSTKKTKQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
5 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGER
ATLSCRASQSVSMPLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISP
10 LAQAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSE
GLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP
WYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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

15 GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLNRRANALL
ANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAI
KSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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 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 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 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 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- QGDSLRSYYAS (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)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG
 20 STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGTILV
 VSR

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

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGI
 PDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTKLTVLG

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

Линкерная последовательность доменов VH и VL показана подчеркиванием

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG
 STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGTILV
 VSRGGGSGGGSGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVL
 30 VIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGK
 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 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTM
 SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGER
 45 ATLSCRASQSVSMPLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
 LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPVAH
 VVANPQAEGQLQWLNRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQGCPT
 HVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRL

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 VRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLNRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGL
YLIYSQVLFGKGQGPCSTHVLLTHTISR α IAVS α YQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWY
EPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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 .
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLES α GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN α SKNTLYLQMN α SLRAEDTA
20 VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTIVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTL α SLSPGER
ATLSCRASQSVSMPFLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISP
LAQAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLNRAANALLANGVELRDNQLVVPSE
GLYLIYSQVLFGKGQGPCSTHVLLTHTISR α IAVS α YQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP
25 WYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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 GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLNRAANALL
ANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGKGQGPCSTHVLLTHTISR α IAVS α YQTKVNLLSAI
KSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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

35 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 .

40 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLES α GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN α SKNTLYLQMN α SLRAEDT
AVYYCAKAHNAFDYWGQGTIVTVSRGGGSGGGSGGGSELTQDPAVSVALGQTVRITC
45 QGDSLRSYYASWYQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED
EADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTKLTVLGSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPV AHVV
ANPQAEGQLQWLNRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGKGQGPCSTHV
LLTHTISR α IAVS α YQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSA

EINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL

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) [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 .

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCAKAHNAFDYWGGQGLVTVSRGGSGGGSGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITC
QGDSLSRYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED
EADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTKLTVLGSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRLDSLISPLA
QAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLNRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGL
YLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWY
EPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL

27. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32A) [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. Мутант TNF α человека в этом конъюгате представляет собой растворимую форму внеклеточного домена TNF α .

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSM
SWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCAKPFYFDYWGGQGLVTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSPGERATLSC
RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF
AVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSSGVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQA
EGQLQWLNRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTI
SRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPD
YLDFAESGQVYFGIHAL

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) [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 .

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSM
SWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCAKPFYFDYWGGQGLVTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSPGERATLSC

RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF
 AVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRS
 SSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQ
 VLFKGQGCPSHVLTHLTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLG
 5 GVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIL

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

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R32A) [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер - мутант
 10 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 .

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 15 CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
 FMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
 DTA VYYCAKPFYFDYWGQGTIVTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTL SLSPGERAT
 LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
 20 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPVAHVVAN
 PQAEGQLQWLNRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSHVLTH
 HTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLG GVFQLEKGDRLSAEINR
 PDYLDFAESGQVYFGIIL

30. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (R52A) [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 конъюгате
 30 представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
 FMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
 35 DTA VYYCAKPFYFDYWGQGTIVTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTL SLSPGERAT
 LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISPLAQ
 VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRAANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLI
 YSQVLFKGQGCPSHVLTHLTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPI
 40 YLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIL

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

Линкерная последовательность доменов VH и VL показана подчеркиванием

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG
 STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKAHNAFDYWGQGTIVT
 45 VSRGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPG
 QAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSVYTMPPVVFG
 GGTKLTVLG

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

[растворимая форма] (SEQ ID NO: 47)

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

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCAKAHNAFDYWGQGT¹⁰LVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCQGD¹⁵SLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
QAEDEADY²⁰YCNSSVYTMPPVVF²⁵GGGT³⁰KLT³⁵VLGSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPV
AHVVANPQAE⁴⁰Q⁴⁵LQWLNRAANALLANGVELRD⁵⁰NQ⁵⁵LV⁶⁰PSEGLYLIYSQVLFK⁶⁵GQ⁷⁰GPC⁷⁵
STHVL⁸⁰L⁸⁵TH⁹⁰TISRI⁹⁵AVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGA¹⁰⁰EAKPWYEP¹⁰⁵IYLG¹¹⁰GVFQLEKGD¹¹⁵
RLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI¹²⁰AL

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

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

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCAKAHNAFDYWGQGT²⁵LVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCQGD³⁰SLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
QAEDEADY³⁵YCNSSVYTMPPVVF⁴⁰GGGT⁴⁵KLT⁵⁰VLGSSSSGSSSSGSSSSG⁵⁵GPQREEFPRDLSL
ISPLAQAVR⁶⁰SSSRTPSDKPV AHVVANPQAE⁶⁵Q⁷⁰LQWLNRAANALLANGVELRD⁷⁵NQ⁸⁰LV⁸⁵P
SEGLYLIYSQVLFK⁹⁰GQ⁹⁵GPC¹⁰⁰STHVL¹⁰⁵L¹¹⁰TH¹¹⁵TISRI¹²⁰AVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGA¹²⁵EAK
PWYEP¹³⁰IYLG¹³⁵GVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI¹⁴⁰AL

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

GGGGSGGGSGGGG

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 мутанта TNFα человека (R32W) (huTNFα R32W) (SEQ ID NO: 52). R32W подчеркнут и выделен полужирным шрифтом.

VRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAE⁵Q¹⁰LQWLN¹⁵RWANALLANGVELRD²⁰NQ²⁵LV³⁰PSEGL
YLIYSQVLFK³⁵GQ⁴⁰GPC⁴⁵STHVL⁵⁰L⁵⁵TH⁶⁰TISRI⁶⁵AVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGA⁷⁰EAKPWY

EPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL

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

5 GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLN^{NR}WANALL
ANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAI
KSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL

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

VRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLN^{RF}ANALLANGVELRDNQLVVPSEGLY
LIYSQVLFGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYE
PIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL

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

GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLN^{RF}ANALL
ANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAI
KSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL

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

VRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLN^{RV}ANALLANGVELRDNQLVVPSEGL
YLIYSQVLFGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWY
25 EPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL

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

30 GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLN^{RV}ANALL
ANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAI
KSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL

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
35 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 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLES^{GG}GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN^{SK}NTLYLQMN^{SL}RAEDTA
VYYCAKSTHLYLFDYWGQGT^{LV}TVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSLSPGER
45 ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDEFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPV AH
VVANPQAEGQLQWLN^{RV}ANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGQGCPST
HVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRL

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 .

APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTILTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGER
ATLSCRASQSVSMPLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISP
LAQAVRSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRLWANALLANGVELRDNQLVVPSE
GLYLIYSQVLFGKGQGPCSTHVLTHITISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP
WYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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 .

APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTILTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGER
ATLSCRASQSVSMPLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPVAVH
VVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGKGQGPCSTH
VLLTHITISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLS
AEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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

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 .

APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTM

SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTIVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTL SLSPGER
 ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
 LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISP
 5 LAQAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSE
 GLYLIYSQVLFGKGQGPCSTHVLTTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP
 WYEPIYLGGVVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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

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

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTM
 SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
 20 VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTIVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTL SLSPGER
 ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
 LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPV AH
 VVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGKGQGPCST
 HVLTTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVVFQLEKGDRL
 25 SAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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

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

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 35 CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTM
 SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAKSTHLYLFDYWGQGTIVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTL SLSPGER
 ATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
 40 LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISP
 LAQAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSE
 GLYLIYSQVLFGKGQGPCSTHVLTTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP
 WYEPIYLGGVVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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

Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNFα (R32W) [растворимая форма] (IL2 человека - линкер - VH L19 - линкер - VL L19 - линкер - мутант
 TNFα (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 .

APTSSSTKKTKQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
 FSMWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
 DTA VYYCAKPFYFDYWGQGT LTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTL SLSPGERAT
 LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSSSGVRSSSRTPSDKPV AHVVAN
 PQAEGQLQWLN RWANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGC PSTHVLL
 THTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEIN
 RPDYLDFAESGQVYFGIIAL

50. Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант huTNF α (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 человека в этом конъюгате представляет собой внеклеточный домен TNF α .

APTSSSTKKTKQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
 FSMWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
 DTA VYYCAKPFYFDYWGQGT LTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTL SLSPGERAT
 LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSSSGGPQREEFPRDLSLISPLAQA
 VRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLN RWANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYL
 IYSQVLFKGQGC PSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPI
 YLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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 .

APTSSSTKKTKQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
 FSMWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
 DTA VYYCAKPFYFDYWGQGT LTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTL SLSPGERAT
 LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
 EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSSSGVRSSSRTPSDKPV AHVVAN
 PQAEGQLQWLN RFANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGC PSTHVLLT
 HTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINR
 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 - 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 .

APTSSSTKKTKQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
FSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAKPFYFDYWGQGT~~LVTVSSGDGSSGGSGG~~ASEIVLTQSPGTL~~SLSPGERAT~~
LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISPLAQA
VRSSSRTPSDKPAHVVANPQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLI
YSQVLFGKGQGPCSTHVL~~LTHTISRI~~AVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPI
YLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGPIAL

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

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 внеклеточного домена TNF α .

APTSSSTKKTKQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
FSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAKPFYFDYWGQGT~~LVTVSSGDGSSGGSGG~~ASEIVLTQSPGTL~~SLSPGERAT~~
LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPAHVVAN
PQAEGQLQWLNRFANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGKGQGPCSTHVL~~LT~~
HTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINR
PDYLDFAESGQVYFGPIAL

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 - 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 .

APTSSSTKKTKQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
FSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAKPFYFDYWGQGT~~LVTVSSGDGSSGGSGG~~ASEIVLTQSPGTL~~SLSPGERAT~~
LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP

EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISPLAQA
VRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQIVPSEGLYLI
YSQVLFGKGQGPCSTHVLTHHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPI
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 .

APTSSSTKKTKLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
15 FMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAKPFYFDYWGQGTIVTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSPGERAT
LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPV AHVVAN
PQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQIVPSEGLYLIYSQVLFGKGQGPCSTHVLTH
20 HTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINR
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 .

APTSSSTKKTKLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
30 NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
FMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAKPFYFDYWGQGTIVTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSPGERAT
LSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSLISPLAQA
35 VRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQIVPSEGLYLI
YSQVLFGKGQGPCSTHVLTHHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPI
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
45 внеклеточного домена TNF α .

APTSSSTKKTKLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG

MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKAHNAFDYWGQGT LVT VSRGGGGSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQT
 VRITCQGD SLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
 QAEDEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGT KLT VLGSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPV
 5 AHVVANPQAEGLQWLNRWANALLANGVELRDNQ LVPSEGLYLIYSQVLFKGQGC
 PSTHVLLTHTISR IAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGD
 RL SAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IAL

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 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
 MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKAHNAFDYWGQGT LVT VSRGGGGSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQT
 20 VRITCQGD SLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
 QAEDEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGT KLT VLGSSSSGSSSSGSSSSGSGPQREEFPRDLSL
 ISPLAQAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGLQWLNRWANALLANGVELRDNQ LVP
 PSEGLYLIYSQVLFKGQGC PSTHVLLTHTISR IAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEA
 KPWYEPIYLGGVFQLEKGDRL SAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IAL

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 .

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 35 NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
 MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKAHNAFDYWGQGT LVT VSRGGGGSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQT
 VRITCQGD SLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
 QAEDEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGT KLT VLGSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPV
 40 AHVVANPQAEGLQWLNRWANALLANGVELRDNQ LVPSEGLYLIYSQVLFKGQGC
 PSTHVLLTHTISR IAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGD
 RL SAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IAL

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 .

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
5 MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
QAEDEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTCLTVLGSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSL
10 ISPLAQAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGLQWLNRVANALLANGVELRDNQLVVP
SEGLYLIYSQVLFGKGQGPCSTHVL LTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK
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) [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 .

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQT
25 VRITCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
QAEDEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTCLTVLGSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPV
AHVVANPQAEGLQWLNRVANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGKGQGPC
STHVL LTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGD
RLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

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 .

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGDGSSGGSGGASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYG
40 MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA
QAEDEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTCLTVLGSSSSGSSSSGSSSSGGPQREEFPRDLSL
ISPLAQAVRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGLQWLNRVANALLANGVELRDNQLVVP
45 SEGLYLIYSQVLFGKGQGPCSTHVL LTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK
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 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 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 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
 40 180 185 190
 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 2 758 139 C2

	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
					260					265					270	
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu
					275									285		
5	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln
					290									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										350	
	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
					355											
															365	
15	Met	Arg	Gly	Arg	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
					370										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										430	
	Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu
					435										445	
25	Val	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe
					450								460			
	Lys	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile
	465												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										510	
	Pro	Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys
					515										525	
35	Gly	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe
					530								540			
	Ala	Glu	Ser	Gly	Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu			
	545						550									

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 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 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

5 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly 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
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 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 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

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 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 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

	20		25		30
	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
	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
10	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				
15	130		135		140
	Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu				
	145		150		155
	<210> 16				
	<211> 577				
20	<212> БЕЛОК				
	<213> Искусственная последовательность				
	<220>				
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F8-huTNF-альфа				
	[внеклеточный домен]				
25	<400> 16				
	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				
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 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				
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 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				
45	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				

RU 2758139 C2

		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	
5			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	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	Gly	Ser	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				
	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					320	
	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					400	
	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					480	
	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					560	
	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 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 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
40 <220>
<223> Аминокислотная последовательность scFv(L19)
<400> 26
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly 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 2758 139 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
10 Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
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 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 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 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 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 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 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 2 758 139 C2

	Thr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	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	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	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	Gly	Le				

RU 2758139 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	
																	225 230 235 240
	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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
10																	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	
																	290 295 300
15	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	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	
																	385 390 395 400
	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	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	
																	465 470 475 480
	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	
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 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
20 25 30
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
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
130 135 140
Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 38

<211> 577

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

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

<400> 38

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
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
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

RU 2758139 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	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
						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	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	
							215					220					
15	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
						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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
20				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	
				290			295					300					
25	Ser	Val	Ser	Met	Pro	Phe	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	
						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	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	
						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	
						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	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
	1				5					10					15	
5	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
10		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	
15	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
20		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
				165					170					175		
25	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	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
30		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
				245					250						255	
35	Val	Thr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	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
		275					280					285				
	Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Ser
40		290					295					300				
	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	Gly
	305					310				315						320
	Lys	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser
				325					330					335		
45	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
		355					360						365			

RU 2758139 C2

	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	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	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	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 2758139 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	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	Gly	Ser	Gly	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	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 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 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 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	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
	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
10					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
	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser
20					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
	Cys	Ala	Lys	Pro	Phe	Pro	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
30					245					250					255	
	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			
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
	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe
40					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 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 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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

RU 2758139 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	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	Ser	Gly	Ser	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 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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
30 130 135 140

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

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 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 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 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

RU 2758139 C2

	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					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			
10	Thr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	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					160	
	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	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	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	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 2758139 C2

	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	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
					165					170					175	
	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
				180				185					190			
10	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
15	225					230				235					240	
	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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
				260				265					270			
20	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
25	305					310					315				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			
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	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
35	385					390				395					400	
	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	Ala	Ala
				420				425					430			
40	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
45	465					470					475				480	
	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
			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	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					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			
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	Gly	Ala
		130				135					140					
	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
35	145					150				155					160	
	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	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					240	
	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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly

		260		265		270											
		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
5		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
					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	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly
15		370					375					380					
		Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly
		385				390					395					400	
		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	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
25		450					455					460					
		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		
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
35		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		
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	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	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 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> БЕЛЮК

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> БЕЛЮК

<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
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

```

5 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 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>

30 <223> Аминокислотная последовательность внеклеточного домена мутанта 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 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

```

	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	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	
20		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		
25	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	
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	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	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	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
			260					265					270				

RU 2758139 C2

	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	
	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	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	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	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	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 2758139 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	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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
30				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
			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	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> БЕЛЮК
 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 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 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 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 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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly						
15		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						
		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 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 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 Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala
 130 135 140
 30 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
 35 180 185 190
 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
 40 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 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 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 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 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 2758139 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	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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
30				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
				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	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
	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 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 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 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 2758139 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					240
	Cys	Ala	Lys	Ser	Thr	His	Leu	Tyr	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
10					245					250					255	
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	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					320
	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile
20					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					400
	Gly	Pro	Gln	Arg	Glu	Glu	Phe	Pro	Arg	Asp	Leu	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro
30					405				410						415	
	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			
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					480
	Gln	Val	Leu	Phe	Lys	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu
40					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>

10 <223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-L19-мутант
huTNF-альфа (R32W) [растворимая форма]

<400> 64

Ala Pro Thr Ser 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
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

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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

30 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

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
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

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

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					
		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 Ser Gly Ser 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 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 Glu Leu Lys					

RU 2758 139 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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	130					135					140					
	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
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	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	Ser	Gly	Ser	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				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					
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				560			
	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	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						
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							
	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu			
35	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						
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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly			
		130					135					140							
	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln			
45	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			

RU 2758139 C2

		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
5		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		
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			
		Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val
15		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		
20		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			
		Arg	Ile	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ser
25		370						375					380				
		Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	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			
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				
		Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	Lys	Gly
35		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			
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				
		Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe	Ala	Glu
45		530						535					540				
		Ser	Gly	Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu					
		545					550					555					
		<210>		67													

<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	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	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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
25		130					135					140				
	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		
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

				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	
5				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	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	
				385				390					395			400	
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	
15				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	
20	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	
25				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	
30	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	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	
45				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	

RU 2758139 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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
				130				135					140			
10	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		
	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	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	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	Ser	Gly	Ser	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	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					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	
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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
	130					135						140					
40	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			
	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	

RU 2758 139 C2

	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	Ser	Gly	Ser	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>	BEJOK															

<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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			130					135					140			
	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	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 2 758 139 C2

[illegible]

RU 2758 139 C2

		115		120		125											
		Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	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				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
				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					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
				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					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	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	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro
35		385					390				395					400	
		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					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				
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 Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His				
	1 5 10 15				
20	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				
25	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				
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				
35	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				
	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 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				
	225 230 235 240				
	Cys Ala Lys Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu				

RU 2758139 C2

					245					250					255	
	Val	Thr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
					260					265					270	
	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala
5					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
10	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	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		
	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	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	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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
				260				265					270			
	Gly	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	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

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	
	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	Val
5				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	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	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	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	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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
				260					265					270			
	Gly	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	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	
	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 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
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys				
			35		40
20	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys				
			50		55
	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
	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
30	Ile Ser Thr Leu Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala				
			130		135
	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				
35			165		170
	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 Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser				
			195		200
40	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu				
			210		215
	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
	Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly				
			260		265
	Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala				

RU 2758139 C2

	275		280		285
	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
	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
10	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 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly				
		370		375	380
15	Ser Ser Ser Ser Gly Ser 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
	Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val				
		420		425	430
20	Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu				
		435		440	445
	Asn Arg Phe 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
	His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu				
		500		505	510
30	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
	<210> 76				
	<211> 556				
40	<212> БЕЛОК				
	<213> Искусственная последовательность				
	<220>				
	<223> Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант				
	huTNF-альфа (R32V) [растворимая форма]				
45	<400> 76				
	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				

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				80	
	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				160	
	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	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					240	
	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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
				260					265					270			
	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	
35			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	
					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	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					400	
	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	Val	Ala	
				420					425					430			
	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu	Val	
5			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		
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>	БЕЛЮК															
	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
25	<223>	Аминокислотная последовательность конъюгата huIL2-F16-мутант															
		huTNF-альфа (R52V) [внеклеточный домен]															
	<400>	77															
	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	
	1				5					10				15			
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	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	Gly	Ala	
45			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	

RU 2758139 C2

					165					170					175			
	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
				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				
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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
				260					265					270				
	Gly	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	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	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

(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 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 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 (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.

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

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

(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-B (ED-B) фибронектина и

(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

(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

(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

(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;

40 где слитый белок содержит 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 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

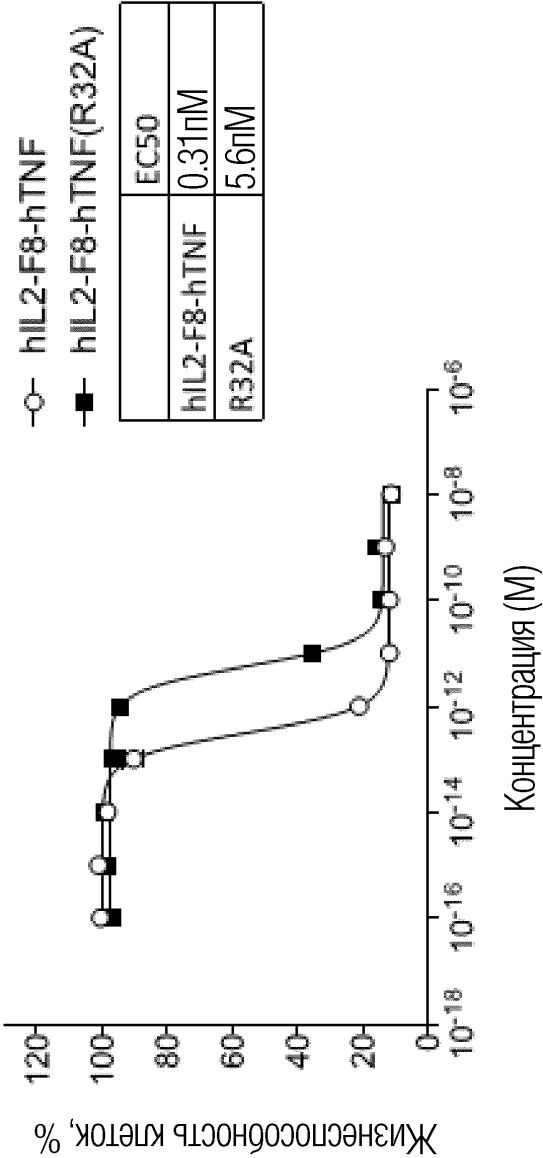
40

45

1

1/5

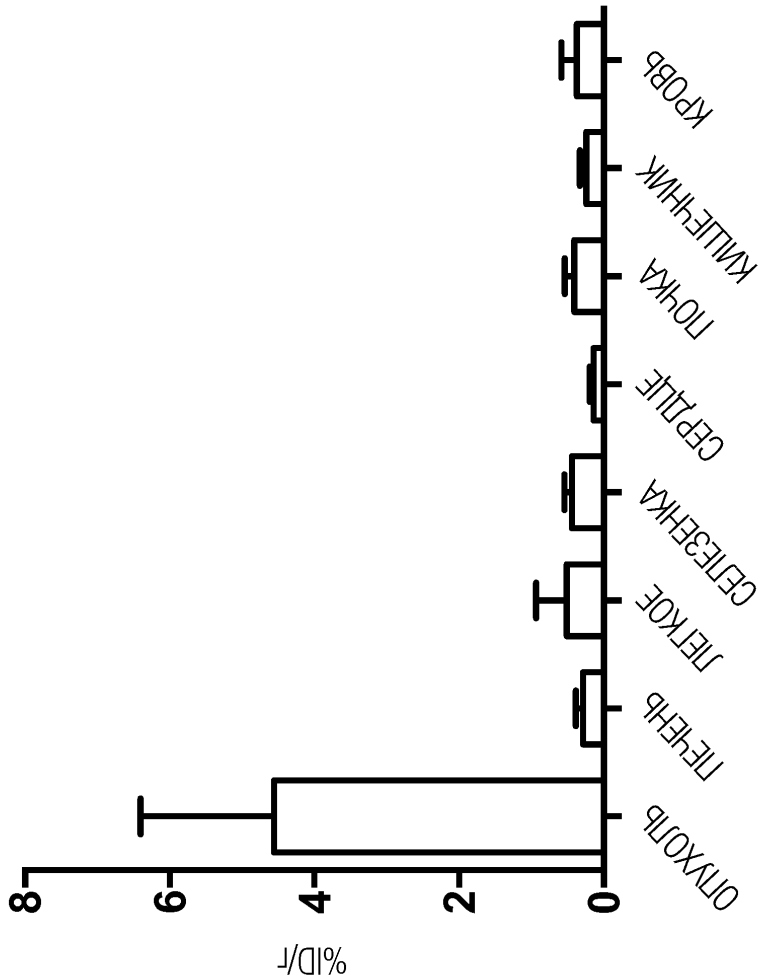
Фибробласт L-M



ФИГ. 1

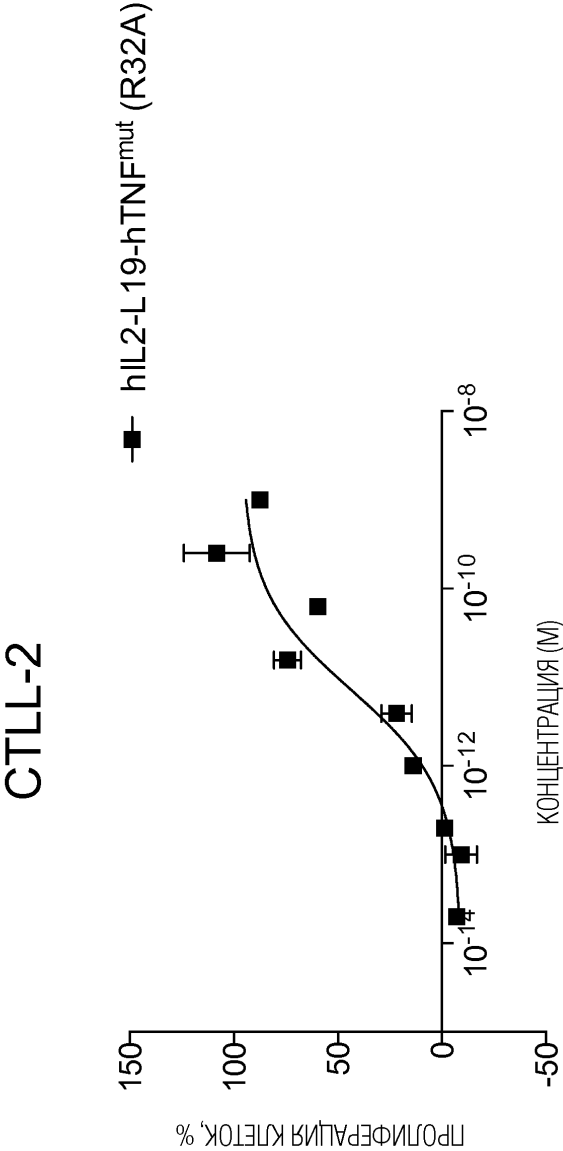
2

2/5



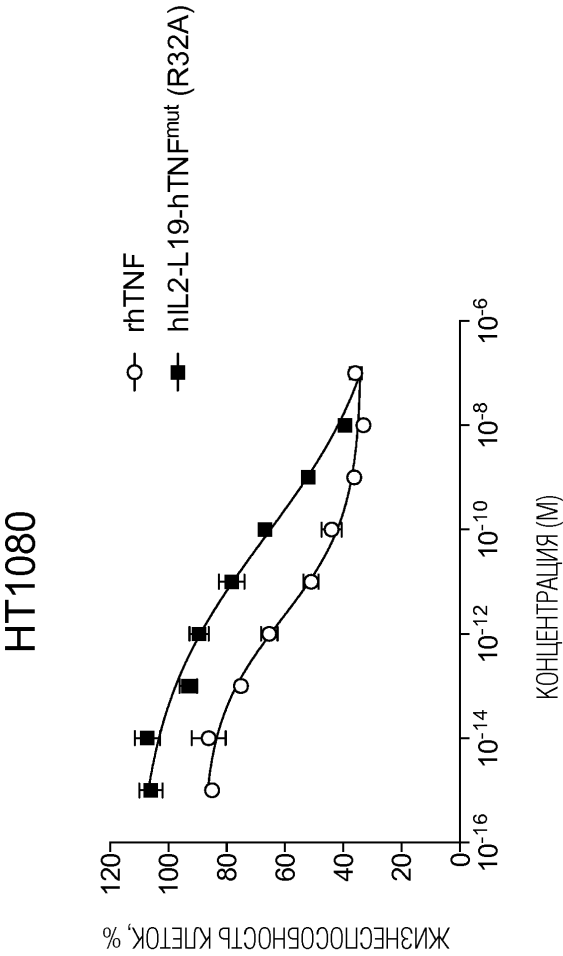
Фиг. 2

3/5



ФИГ. 3

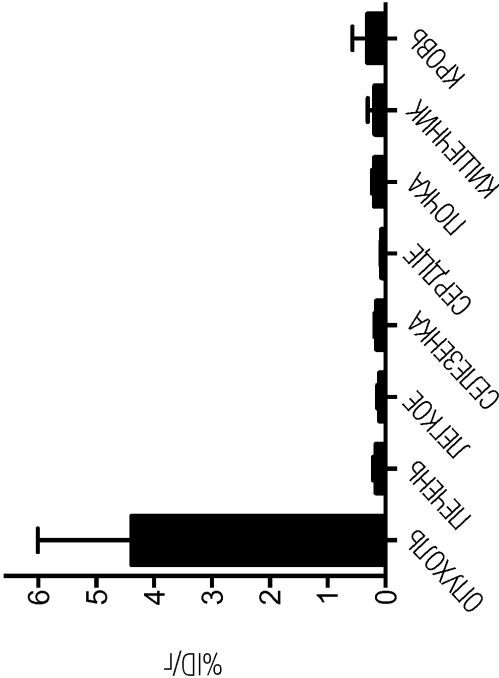
4/5



ФИГ. 4

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