

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043746**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.19**

(51) Int. Cl. **C07K 14/725 (2006.01)**  
**C07K 14/78 (2006.01)**

(21) Номер заявки  
**202090712**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.11.05**

---

(54) **НОВЫЕ ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДАМИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ИММУННАЯ ТЕРАПИЯ С ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ**

---

(31) **102017125888.4; 62/582,202**

(32) **2017.11.06**

(33) **DE; US**

(43) **2020.07.24**

(86) **PCT/EP2018/080176**

(87) **WO 2019/086665 2019.05.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ  
ГМБХ (DE)**

(56) **WO-A2-2011113819**  
**WO-A1-2016156202**

Emma S. Hickma: "Antigen Selection for Enhanced Affinity T-Cell Receptor-Based Cancer Therapies", Journal of Biomolecular Screening Society for Laboratory Automation and Screening, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 769-785, XP55534795, Retrieved from the Internet: URL: <http://citnpl.internal.epo.org/wf/web/citenpl/citenpl.html> [retrieved on 2018-12-14], the whole document

**WO-A1-2018033291**

(72) Изобретатель:  
**Ундердорбен Феликс, Бунк Себастиан,  
Хофманн Мартин, Хутт Майке,  
Маурер Доминик, Алтен Леони,  
Вагнер Клаудиа (DE)**

(74) Представитель:  
**Угрюмов В.М., Гизатуллин Ш.Ф. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к антигенраспознающим структурам к антигенам COL6A3. В частности, в изобретении предложены новые полученные методами генной инженерии молекулы на основе Т-клеточного рецептора (ТКР), являющиеся селективными и специфическими для экспрессируемого опухолями антигена COL6A3. ТКР по изобретению и фрагменты, связывающиеся с антигеном COL6A3, образованные из этого ТКР, полезны для диагностики, лечения и профилактики раковых заболеваний, при которых экспрессируется COL6A3. Предложены также нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенраспознающие структуры по изобретению, векторы, включающие данные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные клетки, экспрессирующие эти антигенраспознающие структуры, и фармацевтические композиции, включающие соединения по изобретению.

---

**B1**

**043746**

**043746**

**B1**

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антигенраспознающим структурам к антигенам COL6A3. В частности, в изобретении предложены новые полученные методами генной инженерии молекулы на основе Т-клеточного рецептора (ТКР), являющиеся селективными и специфическими для экспрессируемого опухолью антигена COL6A3. ТКР по изобретению и фрагменты, связывающиеся с антигеном COL6A3, образованные из этого ТКР, полезны для диагностики, лечения и профилактики раковых заболеваний, при которых экспрессируется COL6A3. Предложены также нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенраспознающие структуры по изобретению, векторы, включающие данные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные клетки, экспрессирующие эти антигенраспознающие структуры, и фармацевтические композиции, включающие соединения по изобретению.

### Описание изобретения

Коллагены являются надсемейством белков, которые играют роль в сохранении целостности различных тканей. Коллагены являются белками внеклеточного матрикса и имеют домен с тройными спиралями в качестве их общего структурного элемента. Коллаген VI является основным структурным компонентом микрофибрилл. Основной структурной единицей коллагена VI является гетеротример альфа 1(VI), альфа 2(VI) и альфа 3(VI) цепей коллагена. Альфа 1(VI)- и альфа 2(VI)-цепи кодируют гены COL6A1 и COL6A2 соответственно. Белок, кодируемый геном COL6A3, - это субъединица альфа-3 коллагена VI типа (альфа-цепь коллагена 3(VI)) (Bertini et al., 2002, Eur. J. Paediatr. Neurol., 6:193-8). Как было продемонстрировано ранее, экспрессия гена COL6A3 ассоциируется с прогрессированием рака молочной железы, и ее уровень был повышен при раке толстой кишки (Smith M.J., et al. "Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification", British journal of cancer. 2009; 100:1452-1464; Tilman G. et al "Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma: evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells", Mol. Cancer. 2007; 6:80), а также выступает в роли прогностического маркера колоректальной карциномы (Qiao J. et al. "Stroma derived COL6A3 is a potential prognosis marker of colorectal carcinoma revealed by quantitative proteomics", Oncotarget. 2015 Oct 6; 6(30):29929-29946). COL6A3 локализован на хромосоме 2q37 человеческого генома и содержит 44 экзона. Белок COL6A3 состоит из 3177 аминокислот и содержит 12 доменов типа А фактора фон Виллебранда (vWA), один домен фибронектина 3 типа и один домен ингибиторов сериновых протеаз (КУ) семейства ВРТИ/Кунитца.

Мишени иммунотерапии, основанной на Т-клетках, представлены пептидными эпитопами, полученными из опухолеассоциированных или опухолеспецифических белков, которые презентуются молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Данные опухолеассоциированные антигены (ТАА) могут быть пептидами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т.д., которые экспрессируются и обычно имеют по сравнению с неизмененными клетками того же происхождения повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к селективному распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение Т-клеток, специфических к опухолевым антигенам, из популяций опухоль-инфильтрирующих клеток или из периферической крови предполагает, что такие клетки играют важную роль в естественной иммунной защите против рака. В частности, CD8-положительные Т-клетки, которые распознают пептиды, связанные с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса, играют важную роль в этом ответе. Эти пептиды обычно состоят из 8-10 аминокислотных остатков, полученных из белков или дефектных рибосомных продуктов (DRiP), находящихся в цитозоле. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

ТКР - это гетеродимерный белок клеточной поверхности надсемейства иммуноглобулинов, которое ассоциируется с инвариантными белками комплекса CD3, участвующими в опосредовании передачи сигналов. ТКР существуют в виде  $\alpha\beta$ - и  $\gamma\delta$ -гетеродимеров, которые сходны по структуре, однако имеют весьма различное анатомическое расположение и, вероятно, функции. Внеклеточная часть встречающегося в природе гетеродимерного  $\alpha\beta$ ТКР состоит из двух полипептидных цепей, каждая из которых имеет расположенный ближе к мембране константный домен и расположенный дальше от мембраны варибельный домен. Каждый из константных и варибельных доменов включает дисульфидную связь внутри цепи. Варибельные домены содержат высокополиморфные петли, аналогичные участкам, определяющим комплементарность (CDR) антител. Применение генной терапии на основе ТКР позволяет преодолеть многие из имеющихся преград. Она позволяет снабдить собственные Т-клетки пациента желаемой специфичностью и вырабатывать достаточное число Т-клеток в короткий период времени без их истощения. ТКР трансдуцируют в центральные Т-клетки памяти или Т-клетки с характеристиками стволовых клеток, что может обеспечить лучшую устойчивость и сохранение функциональности при переносе. Пациентам, больным раком, с лимфопенией, вызванной химиотерапией или лучевой терапией, с помощью инфузии вводят Т-клетки с встроенными ТКР, что позволяет провести успешное приживление, но при этом ингибирует иммуносупрессию.

Несмотря на достижения в разработке молекулярно-таргетных препаратов для противораковой те-

рапии, в этой области остается потребность в развитии новых противораковых препаратов, мишенями которых были бы молекулы, высокоспецифические для раковых клеток. Настоящее описание направлено на удовлетворение этой потребности, предлагая новые модифицированные COL6A3-специфичные ТКР, соответствующие рекомбинантные ТКР-структуры, нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева, которые специфически связываются с предложенными в изобретении эпитопами COL6A3; и способы применения таких молекул в лечении рака.

В первом аспекте задача изобретения решена с помощью антигенраспознающей структуры, включающей первый домен, включающий три комплементарных детерминантных участка (CDR) в соответствии с SEQ ID NO: 5 (CDRa1), 6 (CDRa2) и 7 (CDRa3), и второй домен, включающий три комплементарных детерминантных участка (CDR) в соответствии с SEQ ID NO: 13 (CDRb1), 14 (CDRb2) и 15 (CDRb3), где по меньшей мере один из указанных комплементарных детерминантных участков заменен по меньшей мере на одну последовательность, выбранную из группы: а) SEQ ID NO: 26 (CDRa1-mut1) и SEQ ID NO: 37-49 (CDRb1-mut1 по CDRb1-mut13), предпочтительно SEQ ID NO: 40; и б) последовательности с мутациями SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 37-49, предпочтительно SEQ ID NO: 40, включающую консервативные аминокислотные замены.

В другом аспекте CDRa1 антигенраспознающей структуры может быть по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% идентичен аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 5.

В другом аспекте CDRa2 антигенраспознающей структуры может быть по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% идентичен аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 6.

В другом аспекте CDRa3 антигенраспознающей структуры может быть по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% идентичен аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 7.

В другом аспекте CDRb1 антигенраспознающей структуры может быть по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% идентичен аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 13.

В другом аспекте CDRb2 антигенраспознающей структуры может быть по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% идентичен аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 14.

В другом аспекте CDRb3 антигенраспознающей структуры может быть по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% идентичен аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15.

чен аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15.

В контексте настоящего изобретения авторы изобретения идентифицировали усовершенствованные генетически сконструированные варианты ТКР R4P3F9 к COL6A3, включающие последовательности CDR1 с мутациями в альфа- и бета-цепи(ях), которые улучшают стабильность, способность к распознаванию и селективность исходного R4P3F9. Выбор этих зрелых вариантов ТКР проводили с помощью двухэтапного способа, в котором на первом этапе происходит выбор вариантов по стабильности, а на втором - по аффинности (см. примеры). Поскольку ТКР по изобретению включают участки CDR1 с мутациями, скорее всего, CDR2 и/или CDR3 может также иметь мутацию в целях увеличения аффинности специфичности и/или селективности связывания, и такие мутированные CDR могли бы быть в идеальном случае включены в существующие структуры.

За счет аффинной зрелости были идентифицированы варианты со значительно более сильной активностью связывания по отношению к HLA-A\*02/COL6A3-пептид при сохранении или даже улучшении специфичности. По сравнению с исходным ТКР C-1 (ТКР R4P3F9, включающий CDR дикого типа, см. табл. 5) у всех вариантов по изобретению улучшилось высвобождение IFN-гамма с достижением более высоких уровней уже при более низких концентрациях нагружаемого пептида.

Внутри варибельного домена CDR1 и CDR2 расположены в варибельном домене (V) полипептидной цепи, и CDR3 включает некоторые из V-доменов, все сегменты разнообразия (D) и соединительные сегменты (J). Предполагается, что CDR3 является наиболее варибельным и основным CDR, отвечающим за специфическое и селективное распознавание антигена. Как ни удивительно, в случае некоторых CDR1 рецепторов ТКР, по-видимому, также контактирует пептид и, таким образом, также отвечает за селективное распознавание. В данном случае, без привязки к какой-либо конкретной теории, мутированный CDR1b, по-видимому, взаимодействует с позицией 8 комплекса COL6A3-пептид.

Встречающиеся в природе альфа-бета гетеродимерные TCR имеют альфа-цепь и бета-цепь. Каждая альфа-цепь включает варибельные, соединительные и константные сегменты, а бета-цепь обычно также включает между варибельными и соединительными сегментами короткий сегмент разнообразия, однако этот сегмент разнообразия часто рассматривается как часть соединительного сегмента. Каждая варибельная область включает три участка CDR (Complementarity Determining Regions, участки, определяющие комплементарность), внедренных в каркасную последовательность, один из них является гиперварибельным участком, называемым CDR3. Имеется несколько видов варибельных областей (V $\alpha$ ) альфа-цепи и несколько видов варибельных областей (V $\beta$ ) бета-цепи, различаемых по их каркасным областям, последовательностям CDR1 и CDR2, и по - отчасти определенной - последовательности CDR3. В номенклатуре IMGT (международная иммуногенетическая информационная система) виды V $\alpha$  обладают уникальным номером TRAV, виды V $\beta$  - уникальным номером TRBV.

Предпочтительно, если антигенраспознающая структура согласно изобретению включает соответствующие последовательности с CDR1 по CDR3 одной отдельной раскрытой в данном документе модифицированной варибельной области ТКР согласно изобретению. Предпочтительными являются антигенраспознающие структуры (например,  $\alpha\beta$  и  $\gamma\delta$  ТКР) по изобретению, которые включают по меньшей мере одну, предпочтительно две последовательности CDR1 с созревшей аффинностью.

Варианты CDR, раскрываемые в данном описании, в частности варианты CDR1, могут быть модифицированы путем замены одного или нескольких остатков в различных, возможно селективных, участках пептидной цепи, если не заявлено иное. Такие замены носят консервативный характер, когда одна аминокислота заменяется аминокислотой с похожей структурой и характеристиками, как это происходит при замене гидрофобной аминокислоты на другую гидрофобную аминокислоту. Еще более консервативной будет замена аминокислот одинакового или похожего размера и химического характера, как, например, при замене лейцина на изолейцин. В исследованиях вариаций последовательностей внутри семейств встречающихся в природе гомологичных белков определенные замены аминокислот допускаются чаще, чем другие, и они часто связаны со сходствами по размеру, заряду, полярности и гидрофобности между исходной аминокислотой и ее заменой; и это является основой определения "консервативных замен". Предпочтительные консервативные замены определены в контексте настоящего описания как обмены внутри одной из последующих пяти групп:

- группа 1 - малые, алифатические, неполярные или слабополярные остатки (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly);
- группа 2 - полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды (Asp, Asn, Glu, Gln);
- группа 3 - полярные, положительно заряженные остатки (His, Arg, Lys);
- группа 4 - крупные, алифатические, неполярные остатки (Met, Leu, Ile, Val, Cys);
- группа 5 - крупные, ароматические остатки (Phe, Tyr, Trp).

Менее консервативные замены могут охватывать замену одной аминокислоты другой, имеющей похожие характеристики, но отличающейся в какой-то степени по размеру, как в случае замены аланина остатком изолейцина.

Понятия "специфичность", или "специфичность к антигену", или "специфичный к" данному антигену, используемые в настоящем контексте, означают, что антигенраспознающая структура может специфически связываться с указанным антигеном, предпочтительно антигеном COL6A3, более предпочти-

тельно с высокой avidностью, когда указанный антиген представляется в комплексе с HLA, предпочтительно с HLA A2. Например, можно считать, что ТКР, представленный в качестве антигенраспознающей структуры, имеет "антигенную специфичность" к антигенам COL6A3, если Т-клетки, экспрессирующие ТКР в ответ на HLA, презентующий COL6A3, секретируют по меньшей мере 200 пг/мл или более (например, 250 пг/мл или более, 300 пг/мл или более, 400 пг/мл или более, 500 пг/мл или более, 600 пг/мл или более, 700 пг/мл или более, 1000 пг/мл или более, 2000 пг/мл или более, 2500 пг/мл или более, 5000 пг/мл или более) интерферона  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) при совместном культивировании с клетками-мишенями HLA A2, нагруженными низкой концентрацией антигена COL6A3, такого как эпитопы COL6A3 и антигены, предложенной в настоящем контексте (например, около  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  моль/л). Альтернативно или дополнительно, можно считать, что ТКР имеет "антигенную специфичность" к COL6A3, если Т-клетки, экспрессирующие ТКР, секретируют по меньшей мере в два раза больше IFN- $\gamma$  по сравнению с фоновым уровнем IFN- $\gamma$  в нетрансдуцированных клетках при совместном культивировании с клетками-мишенями, нагруженными низкой концентрацией антигена COL6A3. Анализ такой "специфичности", описанной выше, можно провести, например, с помощью метода ELISA.

В одном альтернативном или дополнительном варианте осуществления изобретения антигенраспознающая структура является стабильной и способной специфически и/или селективно связываться с антигеном COL6A3; предпочтительно, если антиген COL6A3 является эпитопом или пептидом белка с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, или ее вариантом, где вариант содержит делецию, добавление, вставку или замену аминокислоты не более чем в трех, предпочтительно двух и наиболее предпочтительно не более чем в одной аминокислотной позиции.

Под термином "селективность" или "селективное распознавание/связывание" понимается свойство антигенраспознающей структуры, такой как ТКР или антитело, селективно распознавать или связываться предпочтительно только с одним специфическим эпитопом и предпочтительно не проявлять или по существу не проявлять перекрестного взаимодействия с другим эпитопом. Предпочтительно "селективность" или "селективное распознавание/связывание" означает, что антигенраспознающая структура (например, ТКР) селективно распознает или связывается предпочтительно только с одним специфическим эпитопом и предпочтительно не проявляет или по существу не проявляет перекрестного взаимодействия с другим эпитопом, где указанный эпитоп является уникальным для одного белка, так что антигенраспознающая структура не проявляет или по существу не проявляет перекрестного взаимодействия с другим эпитопом и другим белком.

Антигенраспознающая структура в соответствии с изобретением предпочтительно выбрана из антитела, или его производного, или его фрагмента, биспецифической молекулы или Т-клеточного рецептора (ТКР), или его производного, или его фрагмента. Производное или его фрагмент антитела или ТКР по изобретению предпочтительно сохраняет способность связываться/распознавать антиген, свойственную родительской молекуле, в частности ее специфичность и/или селективность, как поясняется выше.

В одном из вариантов осуществления изобретения полученные методом генной инженерии ТКР по изобретению способны распознавать антигены COL6A3 за счет главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса. Понятие "за счет главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса" в контексте настоящего изобретения обозначает, что ТКР вызывает иммунный ответ при связывании с пептидными антигенами COL6A3 в контексте молекулы МНС I класса. Молекула МНС I класса может быть любой молекулой МНС I класса, известной в этой области техники, например молекулами HLA-A. В предпочтительном варианте осуществления изобретения молекула МНС I класса является молекулой HLA-A2.

В изобретении предложены как одноцепочечная антигенраспознающая структура, так и двухцепочечные распознающие структуры, а также другие варианты молекул. В изобретении, в частности, в качестве антигенраспознающей структуры предложен сконструированный ТКР, или его фрагмент, или его производное. Предпочтительно, если это сконструированный ТКР человеческого происхождения, что подразумевает, что он получен из локуса человеческого ТКР и, таким образом, включает последовательности человеческого ТКР. Кроме того, ТКР по изобретению характеризуется как ТКР, обладающий зрелой аффинностью, который способен специфически и селективно распознавать пептидный антиген COL6A3.

В другом варианте осуществления изобретения дополнительно или в качестве альтернативы предложена антигенраспознающая структура, описанная выше, которая вызывает иммунный ответ, предпочтительно, где иммунный ответ характеризуется увеличением уровней интерферона (ИФН)-гамма.

ТКР по изобретению могут быть предложены в виде одноцепочечных  $\alpha$  или  $\beta$  или  $\gamma$  или  $\delta$ , молекул или в качестве альтернативы в виде двухцепочечной структуры, состоящей из обеих цепей,  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи, или  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепи.

Наиболее предпочтительно в некоторых дополнительных вариантах осуществления, в которых изобретение относится к антигенраспознающим структурам, включающим любую одну, две или все области CDR1 по CDR3 раскрытых в настоящем описании сконструированных цепей ТКР (см. табл. 1). Предпочтительными антигенраспознающими структурами могут быть такие, что включают природную или сконструированную последовательность CDR, имеющую три, два и предпочтительно только один модифици-

рованный аминокислотный остаток. Модифицированный аминокислотный остаток может быть выбран из вставки, делеции или замены аминокислоты. Наиболее предпочтительно, когда все три, два, предпочтительно один модифицированный аминокислотный остаток являются первым или последним аминокислотным остатком соответствующей последовательности CDR. Если модификация является заменой, тогда в некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы замена была консервативной заменой аминокислоты.

ТКР согласно изобретению могут дополнительно включать константную область, полученную от любых подходящих видов, таких как любое млекопитающее, например человек, крыса, обезьяна, кролик, осел или мышь. В одном варианте осуществления изобретения ТКР согласно изобретению дополнительно включают константную область человека. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления константная область ТКР по изобретению может быть незначительно модифицирована, например, за счет введения гетерологичных последовательностей, предпочтительно, последовательностей мыши, что может повышать экспрессию и стабильность ТКР.

Также могут быть внедрены и другие стабилизирующие мутации, известные из уровня техники (например, DE 102016123893.7), например замена неблагоприятных аминокислот в V-сегментах и/или введение дисульфидного мостика между C-доменами ТКР и удаление неспаренных цистеинов.

В контексте настоящего описания понятия "мышиный" или "человеческий", когда они относятся к антигенраспознающей структуре, или к ТКР, или к любому из компонентов ТКР, описанных в настоящем контексте (например, участок, определяющий комплементарность (CDR), переменная область, константная область,  $\alpha$ -цепь и/или  $\beta$ -цепь), обозначают ТКР (или его компонент), который получен из локуса мышиного или человеческого ТКР без перегруппировок соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения предложены химерные ТКР, где цепи ТКР включают последовательности нескольких биологических видов. Предпочтительно, когда ТКР согласно изобретению может включать  $\alpha$ -цепь, включающую человеческую переменную область  $\alpha$ -цепи и, например, мышиную константную область  $\alpha$ -цепи ТКР мыши.

В одном варианте осуществления ТКР по изобретению является человеческим ТКР, включающим человеческие переменные области в соответствии с представленными выше вариантами осуществления и человеческие константные области.

ТКР по изобретению может быть предложен в виде одноцепочечного ТКР. Одноцепочечный ТКР может включать полипептид переменной области первой цепи ТКР (например, альфа-цепи) и полипептид всей (полной длины) второй цепи ТКР целиком (например, бета-цепи), или наоборот. Более того, одноцепочечный ТКР может, необязательно, включать один или несколько линкеров, которые соединяют два или более полипептидов друг с другом. Линкер может быть, например, пептидом, который соединяет вместе две одиночные цепи согласно описанию в данном документе. Также предложен такой одноцепочечный ТКР по изобретению, который слит с человеческим цитокином, таким как ИЛ-2, ИЛ-7 или ИЛ-15.

Антигенраспознающая структура в соответствии с изобретением может быть также предложена в форме мультимерного комплекса, включающего по меньшей мере две молекулы одноцепочечных ТКР, где каждая из указанных молекул одноцепочечных ТКР слита по меньшей мере с одним биотиновым компонентом и где указанные одноцепочечные ТКР соединены между собой за счет взаимодействия биотин-стрептавидин, позволяя образовываться указанному мультимерному комплексу. Возможными являются также похожие подходы для получения мультимерных ТКР, и они включены в настоящее изобретение. Также предложены мультимерные комплексы более высокого порядка, включающие более чем два двухцепочечных ТКР по изобретению.

В целях настоящего изобретения ТКР является компонентом, имеющим по меньшей мере один переменный домен альфа- или гамма-цепи ТКР и/или переменный домен бета- или дельта-цепи ТКР. В основном они включают как альфа-переменный домен ТКР, так и бета-переменный домен ТКР. Они могут быть гетеродимерами  $\alpha\beta$  или могут быть в форме отдельной цепи. Для применения в рамках адоптивной терапии  $\alpha\beta$ -гетеродимерные ТКР могут быть, например, трансфицированы как цепи полной длины, имеющие как цитоплазматические, так и трансмембранные домены. По желанию может присутствовать введенная дисульфидная связь между остатками соответствующих константных доменов.

В предпочтительном варианте осуществления антигенраспознающая структура является ТКР человека, или его фрагментом, или его производным. ТКР человека, или его фрагмент, или его производное является ТКР, который включает свыше 50% соответствующей последовательности ТКР человека. Предпочтительно, если только малая часть последовательности ТКР искусственного происхождения или получена от других видов. Тем не менее известно, что преимущества имеют химерные ТКР, например, человеческого происхождения с мышинными последовательностями в константных доменах. Поэтому особенно предпочтительным является ТКР в соответствии с настоящим изобретением, который содержит мышинные последовательности во внеклеточной части их константных доменов.

Таким образом, также предпочтительным является то, что антигенраспознающая структура по изобретению способна распознавать свой пептидный антиген по зависимому от человеческого лейкоцитар-

ного антигена (HLA) механизму, предпочтительно по HLA-A02-зависимому механизму. Понятие "по HLA-зависимому механизму" в контексте настоящего описания означает, что антигенраспознающая структура связывается с антигеном только в том случае, если антигенный пептид презентруется указанным HLA.

Антигенраспознающая структура в соответствии с изобретением в одном варианте осуществления предпочтительно индуцирует иммунный ответ, предпочтительно где иммунный ответ характеризуется повышением уровней интерферона (ИФН)-гамма.

Понятие "полипептид" в контексте настоящего описания включает олигопептиды и относится к одиночной цепи аминокислот, связанных одной или несколькими пептидными связями. В отношении полипептидов по изобретению функциональный участок может быть любым участком, включающим смежные аминокислоты ТКР (или его функционального варианта), частью которого он является, при условии, что функциональный участок специфически связывается с антигеном COL6A3, предпочтительно, как раскрыто в настоящем описании в табл. 1. Понятие "функциональный участок", когда оно используется в отношении ТКР (или его функционального варианта), относится к любой части или фрагменту ТКР (или его функционального варианта) по изобретению, часть или фрагмент которого сохраняет биологическую активность ТКР (или его функционального варианта), частью которого он является (исходный ТКР или его исходный функциональный вариант). Функциональные участки охватывают, например, те части ТКР (или его функционального варианта), которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном COL6A3 (по HLA-A2-зависимому механизму) или выявлять, лечить или предотвращать рак в подобной степени, в равной степени или в большей степени, чем исходный ТКР (или его функциональный вариант).

Функциональный участок может включать дополнительные аминокислоты на аминном или карбоксильном конце участка или на обоих концах, на которых дополнительные аминокислоты не обнаруживаются в аминокислотной последовательности исходного ТКР или его функционального варианта. Желательно, чтобы дополнительные аминокислоты не мешали осуществлению биологической функции функционального участка, например специфическому связыванию с антигенами COL6A3; и/или имеющейся способности выявлять рак, лечить или предотвращать рак и т.д. Более желательно, чтобы дополнительные аминокислоты усиливали биологическую активность по сравнению с биологической активностью исходного ТКР или его функционального варианта.

Как уже упоминалось выше, функциональность по связыванию ТКР по изобретению может быть обеспечена за счет каркаса антитела. Понятие "антитело" в своих различных грамматических формах используется в настоящем контексте для обозначения молекул иммуноглобулина и иммунологически активных участков молекул иммуноглобулина, т.е. молекул, которые содержат антигенсвязывающий центр или паратоп. Такие молекулы называются также "антигенсвязывающие фрагменты" молекул иммуноглобулина. В изобретении далее предложено антитело или его антигенсвязывающий участок, который специфически связывается с антигенами, описанными в настоящем документе. Антитело может быть иммуноглобулином любого вида, известного из уровня техники. Например, антитело может быть любого изотипа, например IgA, IgD, IgE, IgG, IgM и т.д. Антитело может быть моноклональным или поликлональным. Антитело может быть встречавшимся в природе антителом, например антителом, выделенным и/или очищенным из клеток млекопитающего, например мыши, кролика, козы, лошади, курицы, хомяка, человека и т.д. В качестве альтернативы антитело может быть получено методами генной инженерии, например, гуманизированным антителом или химерным антителом. Антитело может быть в форме мономера или полимера.

В изобретении также предложены антигенсвязывающие участки любого из антител, описанных в данном контексте. Антигенсвязывающий участок может быть любым участком, который имеет по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, такой как Fab, F(ab')<sub>2</sub>, dsFv, scFv, диатела и триатела. Одноцепочечный фрагмент вариабельной области (scFv) антитела, который состоит из усеченного фрагмента Fab, включающего вариабельный домен (V) тяжелой цепи антитела, связанного с V-доменом легкой цепи антитела с помощью синтетического пептида, может быть получен с помощью стандартных методик рекомбинантных ДНК. Подобным образом стабилизированные дисульфидной связью фрагменты вариабельной области (dsFv) могут быть получены по технологии рекомбинантных ДНК, фрагменты антител по изобретению тем не менее не ограничены этими отдельными типами фрагментов антител. Также антитело или его антигенсвязывающий участок могут быть модифицированы таким образом, чтобы включать поддающуюся обнаружению метку, такую как, например, радиоизотоп, флуорофор (например, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE)), фермент (например, щелочную фосфатазу, пероксидазу хрена) и частицы элементов (например, частицы золота).

Подходящие способы получения антител известны из уровня техники. Например, стандартные гибридомные технологии описаны, например, в работе Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol, 5, 51:1-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988) и C.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 8 Ed., Garland Publishing, New York, NY (2011)). В качестве альтернативы другие способы, такие как технологии гибридомы EBV (Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984) и Roder et al., Methods Enzymol, 121, 140-67 (1986)) и векторные системы экспрессии на основе

бактериофагов (см., например, Huse et al., Science, 246, 1275-81 (1989)), известны из уровня техники. Кроме того, способы получения антител у животных нечеловеческого происхождения описаны, например, в патентах США № 5545806, 5569825 и 5714352 и патентной заявке США № 2002/0197266.

Некоторые варианты осуществления изобретения также относятся к ТКР или их функциональным фрагментам и их полипептидам, которые являются растворимыми ТКР. В контексте настоящего описания понятие "растворимый Т-клеточный рецептор" относится к одноцепочечным или гетеродимерным усеченным вариантам природных ТКР, которые включают по меньшей мере переменные домены  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи ТКР, связанные полипептидным линкером (SEQ ID NO: 22, 24, 25 и 27). У растворимых вариантов ТКР, как правило, отсутствуют по меньшей мере трансмембранные и цитозольные домены природного белка; иногда такие растворимые структуры предпочтительно не содержат никакие последовательности константных доменов. Структуры растворимого Т-клеточного рецептора по изобретению в предпочтительных вариантах осуществления включают структуры, состоящие из последовательностей переменных доменов  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи, предложенных в настоящем контексте, соединенных с помощью подходящей линкерной последовательности. Последовательность переменного домена (аминокислот или нуклеиновых кислот)  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи растворимого ТКР может быть идентичной соответствующим последовательностям природного ТКР или может включать варианты последовательностей  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи переменного домена растворимого ТКР по сравнению с соответствующими последовательностями природного ТКР. Понятие "растворимый Т-клеточный рецептор", используемое в настоящем контексте, включает растворимые ТКР с вариантными или невариантными последовательностями  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи переменного домена растворимого ТКР. Вариации могут быть в каркасных и/или CDR-областях последовательностей переменных доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи растворимого ТКР и могут включать, но без ограничения, мутации аминокислотной делеции, вставки, замены, а также изменения в последовательности нуклеиновой кислоты, которые не изменяют аминокислотную последовательность. Растворимый ТКР по изобретению в любом случае сохраняет или преимущественно улучшает функциональность своих исходных молекул ТКР по связыванию.

Обозначенная выше проблема решена также с помощью нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенраспознающую структуру по изобретению или любую из упомянутых ранее белковых или полипептидных структур. Нуклеиновая кислота предпочтительно может (а) иметь нить, кодирующую антигенраспознающую структуру в соответствии с изобретением; (б) иметь нить, комплементарную по отношению к нити из (а); или (в) имеет нить, которая при жестких условиях гибридизируется с молекулой, описанной в (а) или (б). Жесткие условия известны специалисту в данной области, в частности, из работы Sambrook и соавт., "Molecular Cloning". Кроме того, нуклеиновая кислота необязательно имеет дополнительные последовательности, которые необходимы для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, соответствующей белку, в особенности для экспрессии в клетке млекопитающего/человека. Используемая нуклеиновая кислота может быть включена в вектор, пригодный для осуществления экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, соответствующей полипептиду, в клетке. Тем не менее нуклеиновые кислоты могут также использоваться для трансформации антигенпрезентирующей клетки, которые не ограничиваются классическими антигенпрезентирующими клетками, такими как дендритные клетки, таким образом, что они сами образуют соответствующие белки на их клеточной поверхности.

Понятие "нуклеиновая кислота" в настоящем контексте включает "полинуклеотид", "олигонуклеотид" и "молекулу нуклеиновой кислоты" и в общем обозначает полимер ДНК или РНК, который может быть одноцепочечным или двухцепочечным, синтезированным или полученным (например, выделенным и/или очищенным) из природных источников, который может содержать встречающиеся в природе, не встречающиеся в природе или измененные нуклеотиды и может содержать встречающуюся в природе, не встречающуюся в природе или измененную межнуклеотидную связь, такую как фосфоамидатную связь или фосфоротиоатную связь вместо фосфодиэфирной, существующей между нуклеотидами немодифицированного олигонуклеотида.

Предпочтительно, если нуклеиновые кислоты по изобретению являются рекомбинантными. В настоящем контексте понятие "рекомбинантный" означает (i) молекулы, конструкции которых получены вне живых клеток за счет соединения фрагментов встречающихся в природе или синтетических нуклеиновых кислот с молекулами нуклеиновых кислот, которые могут реплицироваться в живой клетке; или (ii) молекул, полученных в результате репликации тех, что описаны выше в (i). В целях настоящего изобретения репликация может быть репликацией *in vitro* или репликацией *in vivo*. Нуклеиновая кислота может включать любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует любой из ТКР, полипептидов или белков или их функциональных фрагментов или функциональных вариантов, описанных в настоящем контексте.

Кроме того, в изобретении предложен вектор, включающий нуклеиновую кислоту в соответствии с изобретением, как описано выше. Желательно, чтобы вектор являлся вектором экспрессии или рекомбинантным вектором экспрессии. Понятие "рекомбинантный вектор экспрессии" в контексте настоящего изобретения относится к нуклеиново-кислотной конструкции, которая делает возможной экспрессию



мРНК, белка или полипептида в подходящей клетке-хозяине. Рекombинантный вектор экспрессии по изобретению может быть любым подходящим рекombинантным вектором экспрессии и может быть использован для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Подходящие векторы включают такие векторы, которые сконструированы для распространения и размножения или для экспрессии или того и другого, такие как плазмиды и вирусы. Примеры векторов экспрессии животных включают рEUK-CI, рMAM и рMAMneo. Предпочтительно, когда рекombинантный вектор экспрессии является вирусным вектором, например, ретровирусным вектором. Рекombинантный вектор экспрессии включает регуляторные последовательности, такие как инициации транскрипции и трансляции и терминирующие кодоны, которые являются специфическими для вида клетки-хозяина (например, бактериальная, грибная, растительная или животная), в которую необходимо ввести вектор и в которой может быть осуществлена экспрессия нуклеиновой кислоты по изобретению. Кроме того, вектор согласно изобретению может включать один или более маркерный ген, который позволяет производить выбор трансформированных или трансфицированных хозяев. Рекombинантный вектор экспрессии может включать нативный или нормальный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей структуры по изобретению или с нуклеотидной последовательностью, которая является комплементарной по отношению к или которая гибридизируется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей структуры по изобретению. Выбор промоторов включает, например, сильные, слабые, индуцируемые, специфические для тканей и органов промоторы. Промотор может быть вирусного или невирусного происхождения. Рекombинантные векторы экспрессии по изобретению могут быть сконструированы для кратковременной или устойчивой экспрессии или обоих видов. Также рекombинантные векторы экспрессии могут быть сконструированы для конститутивной экспрессии или для индуцируемой экспрессии.

Изобретение также относится к клетке-хозяину, включающей антигенраспознающую структуру в соответствии с изобретением. В частности, клетка-хозяин по изобретению содержит нуклеиновую кислоту или вектор, как описано в данном контексте выше. Клетка-хозяин может быть эукариотической клеткой, например клеткой растения, животного, грибов или водорослей, или может быть прокариотической клеткой, например клеткой бактерий или простейших. Клетка-хозяин может быть клеткой из культуры или первичной клеткой, т.е. выделенной непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может быть прилипающей клеткой или суспендированной клеткой, т.е. клеткой, выращиваемой в суспензии. В целях получения рекombинантного ТКР, полипептида или белка клетка-хозяин предпочтительно является клеткой млекопитающего, например клеткой яичника китайского хомяка (СНО). Наиболее предпочтительно, чтобы клетка-хозяин являлась клеткой человека. Хотя клетка-хозяин может быть клеткой любого вида, может быть получена из любого вида ткани и может находиться на любой стадии развития, предпочтительно, чтобы клетка-хозяин являлась лейкоцитом периферической крови (ЛПК) или мононуклеарной клеткой периферической крови (МКПК). Более предпочтительно, если клетка-хозяин является Т-клеткой. Т-клетка может быть любой Т-клеткой, такой как Т-клетка из культуры клеток, например первичной Т-клеткой, или Т-клеткой из культуры линии Т-клеток, например Jurkat, SupT1 и т.д., или Т-клеткой, полученной из организма млекопитающего, предпочтительно Т-клеткой или предшественником Т-клетки организма пациента-человека. Если Т-клетка получена из организма млекопитающего, то она может быть получена из многочисленных источников, включая кровь, костный мозг, лимфатический узел, вилочковую железу или другие ткани или жидкости, но без ограничения перечисленным. Т-клетки также могут быть обогащены или очищены. Предпочтительно, если Т-клетка является Т-клеткой человеческого происхождения. Более предпочтительно, если Т-клетка является Т-клеткой, выделенной из человеческого организма. Т-клетка может быть Т-клеткой любого вида и любой стадии развития, включая CD4-положительные и/или CD8-положительные, CD4-положительные хелперные Т-клетки, например клетки Th1 и Th2, CD8-положительные Т-клетки, например цитотоксические Т-клетки, инфильтрующие опухоль клетки (ТИЛ), Т-клетки памяти, наивные Т-клетки и т.п., но без ограничения перечисленным. Предпочтительно, если Т-клетка является CD8-положительной Т-клеткой или CD4-положительной Т-клеткой.

Предпочтительно, если клетка-хозяин по изобретению является лимфоцитом, предпочтительно Т-лимфоцитом, таким как CD4-положительная или CD8-положительная Т-клетка. Клетка-хозяин, кроме того, предпочтительно является опухолерективной Т-клеткой, специфической для опухолевых клеток, экспрессирующих COL6A3.

В еще одном другом аспекте настоящее изобретение относится к предложенным в настоящем контексте антигенраспознающим структурам, нуклеиновым кислотам, векторам, фармацевтическим композициям и/или клетке-хозяину для применения в медицине. Применение в медицине в одном предпочтительном варианте осуществления включает применение в диагностике, предупреждении и/или лечении опухолевого заболевания, такого как злокачественное или доброкачественное опухолевое заболевание. Опухолевое заболевание является, например, опухолевым заболеванием, характеризующимся экспрессией COL6A3 в раковой или опухолевой клетке указанного опухолевого заболевания.

В отношении у помянутого медицинского применения антигенраспознающих структур и других материалов, полученных из них, подлежащее лечению и/или диагностике раковое заболевание может

быть любым видом рака, включая любое из заболеваний: острый лимфоцитарный рак, острый миелолейкоз, альвеолярная рабдомиосаркома, рак кости, рак головного мозга, рак молочной железы, рак анального отверстия, анального канала или аноректальной области, рак глаза, рак внутривенных желчных протоков, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, полости носа или среднего уха, рак полости рта, рак влагалища, рак вульвы, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелодидный рак, рак толстой кишки, рак пищевода, рак шейки матки, гастроинтестинальная карциноидная опухоль, глиома, ходжкинская лимфома, рак гортаноглотки, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легких, злокачественная мезотелиома, меланома, множественная миелома, рак носоглотки, неходжкинская лимфома, рак ротоглотки, рак яичника, рак пениса, рак поджелудочной железы, брюшины, сальника и рак брыжейки, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечный рак, рак кожи, рак тонкой кишки рак мягких тканей, рак желудка, рак яичек, рак щитовидной железы, рак матки, рак мочеочника и рак мочевого пузыря. Предпочтительным видом рака является рак шейки матки, ротоглотки, анального отверстия, анального канала, аноректальной области, влагалища, вульвы или пениса. Особенно предпочтительным видом рака является СОL6A3-положительный рак, включая гастроинтестинальный рак и рак желудка.

Структуры, белки, антитела к ТКР, полипептиды и нуклеиновые кислоты по изобретению предназначены, в частности, для применения в иммунной терапии, предпочтительно в адоптивной Т-клеточной терапии. Введение соединений по изобретению может, например, включать инфузию Т-клеток по изобретению указанному пациенту. Предпочтительно, если такие Т-клетки являются аутологичными клетками пациента, трансдуцированными *in vitro* нуклеиновой кислотой или антигенраспознающей структурой согласно настоящему изобретению.

В заявке WO 2016/011210 предложены клетки, сконструированные для адоптивной терапии, в том числе NK-клетки и Т-клетки, и композиции, содержащие эти клетки, а также способы их введения субъектам. Эти клетки могут содержать полученные методами генной инженерии антигенные рецепторы, которые специфически связываются с антигенами, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR) и костимулирующие рецепторы.

Задача изобретения также решена за счет предложения способа получения линии клеток, экспрессирующей СОL6A3-специфичную антигенраспознающую структуру, включающего:

- а) обеспечение подходящей клетки-хозяина;
- б) обеспечение генетической конструкции, включающей кодирующую последовательность, кодирующую антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп.1-4;
- в) внесение указанной генетической конструкции в указанную подходящую клетку-хозяина и
- г) экспрессию указанной генетической конструкции указанной подходящей клеткой-хозяином.

Способ может далее включать этап презентации указанной антигенраспознающей структуры на поверхности указанной подходящей клетки-хозяина.

В других предпочтительных вариантах осуществления генетическая конструкция является экспрессионной конструкцией, включающей промоторную последовательность, функционально связанную с указанной кодирующей последовательностью.

Предпочтительно, если указанная антигенраспознающая структура происходит от млекопитающего, предпочтительно от человека. Предпочтительная подходящая клетка-хозяин для применения в способе по изобретению является клеткой млекопитающего, такой как клетка человека, в частности Т-лимфоцит человека. Т-клетки для применения в изобретении описаны в настоящем контексте выше.

Изобретение включает также варианты осуществления, где указанная антигенраспознающая структура является модифицированным ТКР, где указанная модификация представляет собой добавление функциональных доменов, таких как метка или терапевтически активная субстанция. Кроме того, предложены ТКР с альтернативными доменами, такими как альтернативный мембранный якорный домен вместо эндогенной трансмембранной области.

Желательно, если система трансфекции для введения генетической конструкции в указанную подходящую клетку-хозяина является ретровирусной векторной системой. Такие системы хорошо известны для опытного специалиста.

В настоящее изобретение также включен в одном варианте осуществления дополнительный этап способа - выделения и очистки антигенраспознающей структуры из клетки и, необязательно, восстановления транслированных фрагментов антигенраспознающей структуры в Т-клетке.

В альтернативном аспекте изобретения предложена Т-клетка, полученная или которую можно получить способом получения Т-клеточного рецептора (ТКР), который специфичен для опухолевых клеток и обладает высокой авидностью, как это описывалось ранее в настоящем контексте. Такая Т-клетка зависит от клетки-хозяина, используемой в способе по изобретению, например, Т-клетка человеческого или нечеловеческого происхождения, предпочтительно, ТКР человеческого происхождения.

ТКР, полипептиды, белки, (в том числе их функциональные варианты), нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева (в том числе их популяции) и антитела (в том числе их антигенсвязывающие фрагменты) по изобретению могут быть выделены и/или очищены. Понятие "выделенный", используемое в настоящем контексте, означает удаление из естественного окружения.

Понятие "очищенный", используемое в настоящем контексте, означает увеличение степени чистоты, причем "чистота" является относительным понятием и не должно обязательно истолковываться как абсолютная чистота. Например, чистота может быть по меньшей мере около 50, может быть более 60, 70, 80, 90, 95 или может быть 100%.

Антигенраспознающие структуры, ТКР, полипептиды, белки (в том числе их функциональные варианты), нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева (в том числе их популяции) и антитела (в том числе их антигенсвязывающие фрагменты) по изобретению, все из которых далее именуется совместно "ТКР-материалы по изобретению", могут быть в составе композиции, такой как фармацевтическая композиция. В этом отношении в изобретении также предложена фармацевтическая композиция, включающая любые из антигенраспознающих структур, ТКР, полипептидов, белков, функциональных фрагментов, функциональных вариантов, нуклеиновых кислот, векторов экспрессии, клеток-хозяев (в том числе их популяции) и антител (в том числе их антигенсвязывающие фрагменты), описанных в настоящем контексте, и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или стабилизатор. Фармацевтические композиции по изобретению, содержащие любой из ТКР-материалов по изобретению, могут включать более чем один ТКР-материал по изобретению, например полипептид и нуклеиновую кислоту или два или более различных ТКР (в том числе их функциональные фрагменты и функциональные варианты). Альтернативно, фармацевтические композиции могут включать ТКР-материал по изобретению в комбинации с другим(и) фармацевтически активным(и) веществом(ами) или лекарственным(и) средством(ами), таким как химиотерапевтические средства, например аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубин, доксорубин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д. Предпочтительно, если носитель является фармацевтически приемлемым носителем. В отношении фармацевтических композиций носитель может быть любым из обычно используемых для конкретного рассматриваемого ТКР-материала по изобретению. Такие фармацевтически приемлемые носители хорошо известны специалистам данной области и являются общедоступными. Предпочтительно, чтобы фармацевтически приемлемый носитель был таким, который в условиях применения не имеет негативных побочных эффектов или токсичности.

Таким образом, также предложена фармацевтическая композиция, включающая любой из описанных в контексте продуктов по изобретению и ТКР-материалов по изобретению, в особенности любые белки, нуклеиновые кислоты или клетки-хозяева. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция предназначена для иммунной терапии, предпочтительно для адоптивной клеточной терапии.

Предпочтительно, чтобы ТКР-материал по изобретению вводился с помощью инъекции, например, внутривенно. Если ТКР-материал по изобретению является клеткой-хозяином, экспрессирующей ТКР по изобретению (или его функциональный вариант), фармацевтически приемлемый носитель для клеток инъекции может включать любой изотонный носитель, такой как, например, нормальный физиологический раствор (около 0,90% мас./об. NaCl в воде, около 300 мОсм/л NaCl в воде или около 9,0 г NaCl на 1 л воды), электролитный раствор NORMOSOL R (Abbott, Чикаго, Иллинойс, США), PLASMA-LYTE A (Baxter, Дирфилд, Иллинойс, США), около 5% декстрозы в воде или Рингера лактат. В одном варианте осуществления в фармацевтически приемлемый носитель добавлен сывороточный альбумин человека.

В целях настоящего изобретения количество или доза (например, количество клеток, когда ТКР-материал по изобретению является одной или несколькими клетками) вводимого ТКР-материала по изобретению могут быть достаточными для оказания влияния, например вызвать терапевтический или профилактический ответ, у субъекта или животного в течение приемлемого промежутка времени. Например, доза ТКР-материала по изобретению должна быть достаточной для связывания с раковым антигеном или для выявления, лечения или предупреждения рака в течение периода времени от около 2 ч или дольше, например 12-24 ч или более, начиная с момента введения. В определенных вариантах осуществления период времени может быть даже длиннее. Дозу определяют по эффективности конкретного ТКР-материала по изобретению и состоянию животного (например, человека), а также по весу тела животного (например, человека), подлежащего лечению.

Во внимание принимается тот факт, что фармацевтические композиции по изобретению, ТКР (в том числе их функциональные варианты), полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева или популяции клеток могут применяться в способах лечения или предупреждения рака или COL6A3-положительного предопухолевого состояния. ТКР по изобретению (и их функциональные варианты), как считается, специфически связываются с антигеном COL6A3, так что ТКР (или родственный полипептид или белок по изобретению и их функциональные варианты), когда он экспрессируется клеткой, способен опосредовать иммунный ответ по отношению к клетке-мишени, экспрессирующей антигена COL6A3 по изобретению. В этом отношении в изобретении предложен способ лечения или предупреждения состояния, в частности рака, у млекопитающего, включающий введение млекопитающему любых из фармацевтических композиций, антигенраспознающих структур, в частности ТКР (и их функциональных вариантов), полипептидов или белков, описанных в настоящем контексте, любой нуклеиновой кислоты или рекомбинантного вектора экспрессии, включающего нуклеотид-

ную последовательность, кодирующую любой из ТКР (и их функциональных вариантов), полипептидов, белков, описанных в настоящем контексте, или любой клетки-хозяина или популяции клеток, включающей рекомбинантный вектор, который кодирует любую из структур по изобретению (и их функциональные варианты), полипептиды или белки, описанные в настоящем контексте, в количестве, эффективном для лечения или предупреждения состояния у млекопитающего, где состояние является раком, предпочтительно СОL6A3-положительным раком.

Примеры фармацевтически приемлемых носителей или разбавителей, применимых в рамках настоящего изобретения, включают стабилизаторы, такие как СФГА, углеводы (например, сорбит, маннит, крахмал, сахароза, глюкоза, декстран), белки, такие как альбумин или казеин, содержащие белок продукты, такие как бычья сыворотка или обезжиренное молоко, и буферы (например, фосфатный буфер).

Понятия "лечить" и "предупреждать", а также образованные от них слова в контексте настоящего описания необязательно подразумевают 100%-ное или полное излечение или предупреждение. Скорее, это разные степени излечения или предупреждения, которые средний специалист данной области определяет как имеющие потенциальную пользу или терапевтический эффект. В этом отношении способы по изобретению могут обеспечить любую степень любого уровня излечения или предупреждения патологического состояния у млекопитающего. Кроме того, лечение или предупреждение, обеспечиваемые способом по изобретению, могут включать лечение или предупреждение одного или нескольких патологических состояний или симптомов этих состояний, например, рака, подвергающихся лечению или предупреждению. Например, лечение или предупреждение может включать стимуляцию регрессии опухоли. Также в целях настоящего изобретения "предупреждение" может охватывать замедление развития патологического состояния или его симптома или состояния.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака, включающему введение ТКР, нуклеиновой кислоты или клетки-хозяина согласно настоящему описанию в комбинации с по меньшей мере одним химиотерапевтическим препаратом и/или лучевой терапией.

Также предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в нем, включающий:

- а) выделение клетки из организма указанного субъекта;
- б) трансформацию клетки по меньшей мере одним вектором, кодирующим антигенраспознающую структуру согласно настоящему изобретению, для получения трансформированной клетки;
- в) культивирование трансформированной клетки для получения множества трансформированных клеток;
- г) введение множества трансформированных клеток указанному субъекту.

Также предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в нем, включающий:

- а) выделение клетки из организма здорового донора;
- б) трансформацию клетки вектором, кодирующим антигенраспознающую структуру согласно настоящему изобретению, для получения трансформированной клетки;
- в) культивирование трансформированной клетки для получения множества трансформированных клеток; и
- г) введение множества трансформированных клеток указанному субъекту.

Также предложен способ выявления рака в биологическом образце, включающий:

- а) контактирование биологического образца с антигенраспознающей структурой согласно настоящему описанию;
- б) выявление связывания антигенраспознающей структуры с биологическим образцом.

В некоторых вариантах осуществления способ выявления рака осуществляется *in vitro*, *in vivo* или *in situ*.

Также предложен способ выявления патологического состояния у млекопитающего. Способ включает (i) контактирование образца, включающего одну или более клеток млекопитающего, с любыми из ТКР (и их функциональными вариантами), полипептидов, белков, нуклеиновых кислот, рекомбинантных векторов экспрессии, клеток-хозяев, популяций клеток, антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению или фармацевтическими композициями, описываемыми в настоящем контексте, что ведет к образованию комплекса; и (ii) выявление этого комплекса, причем выявление этого комплекса является индикатором наличия патологического состояния у млекопитающего, где состояние является раковым заболеванием, таким как СОL6A3-положительное злокачественное заболевание.

В отношении способа выявления патологического состояния у млекопитающего, образцом клеток может быть образец, содержащий цельные клетки, их лизаты или фракцию лизата цельных клеток, например ядерную или цитоплазматическую фракцию, фракцию цельных белков или фракцию нуклеиновых кислот.

В целях способа выявления по изобретению контактирование по отношению к млекопитающему может проходить *in vitro* или *in vivo*. Предпочтительно, если контактирование проходит *in vitro*.

Выявление комплекса может также осуществляться с помощью любого количества способов, известных из уровня техники. Например, антигенраспознающие структуры (и их функциональные варианты), полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева, популяции клеток или антитела или ТКР или их антигенсвязывающие фрагменты, описываемые в на-

стоящем контексте, могут быть помечены поддающейся обнаружению меткой, такой как, например, радиоизотоп, флуорофор (например, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE)), фермент (например, щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена) и частицы элементов (например, частицы золота).

В целях способов по изобретению, когда вводятся клетки-хозяева или популяции клеток, клетки могут быть клетками, которые являются аллогенными или аутологичными по отношению к млекопитающему. Предпочтительно, если клетки являются аутологичными по отношению к млекопитающему.

В отношении упомянутых ранее видов медицинского применения ТКР-материала согласно изобретению, требующее лечения и/или диагностики раковое заболевание может быть любым раковым заболеванием, включая острый лимфоцитарный рак, острый миелолейкоз, альвеолярная рабдомиосаркома, рак кости, рак головного мозга, рак молочной железы, рак анального отверстия, анального канала или аноректальной области, рак глаза, рак внутривенных желчных протоков, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, полости носа или среднего уха, рак полости рта, рак влагалища, рак вульвы, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный рак, рак толстой кишки, рак пищевода, рак шейки матки, гастроинтестинальная карциноидная опухоль, глиома, ходжкинская лимфома, рак гортаноглотки, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легких, злокачественная мезотелиома, меланома, множественная миелома, рак носоглотки, неходжкинская лимфома, рак ротоглотки, рак яичника, рак пениса, рак поджелудочной железы, брюшины, сальника и рак брыжейки, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечный рак, рак кожи, рак тонкой кишки, рак мягких тканей, рак желудка, рак яичек, рак щитовидной железы, рак матки, рак мочеочника и рак мочевого пузыря. Предпочтительным видом рака является рак шейки матки, ротоглотки, анального отверстия, анального канала, аноректальной области, влагалища, вульвы или пениса. Особенно предпочтительным видом рака является COL6A3-положительный рак, такой как гастроинтестинальный рак и рак желудка.

В целом, в изобретении предложен способ лечения субъекта, страдающего от опухоли или опухолевого заболевания, который включает введение антигенраспознающих структур, нуклеиновых кислот, векторов, фармацевтических композиций и/или клетки-хозяина, как раскрыто в настоящем изобретении. Предпочтительно, если субъект является субъектом, которому необходимо такое лечение. Субъект в предпочтительных вариантах осуществления является млекопитающим субъектом, предпочтительно пациентом человеческого происхождения, страдающим от опухоли или опухолевого заболевания, являющегося COL6A3-положительным.

Настоящее изобретение будет далее описано с помощью последующих примеров со ссылкой на сопровождающие фигуры и последовательности, тем не менее, не ограничивая ими изобретение. В соответствии с целями настоящего изобретения все цитируемые источники включены в данное описание во всей полноте путем ссылки. На фигурах и в последовательностях:

На фиг. 1 представлено превращение ТКР в стабилизированный  $V\alpha/V\beta$  одноцепочечный ТКР (scTv) за счет поверхностного дисплея на основе дрожжей. Молекулы scTv, представленные на поверхности трансформированных клеток *Saccharomyces cerevisiae* EBY100, окрашивали антителом к  $V\beta 1$ , меченым FITC, и тетрамером HLA-A\*02/COL6A3-002, меченным PE. Немодифицированный scTv R4P3F9 (левая секция, SEQ ID NO: 22) сравнивается с клоном scTv с одноцепочечными мутациями в целях стабилизации каркаса scTv (правая секция), который был получен с помощью отбора из библиотеки случайных мутаций scTv.

На фиг. 2 представлено созревание аффинности scTv с помощью поверхностного дисплея на основе дрожжей. Для стабилизированных молекул scTv, содержащих или не содержащих бета-цепь CDR1 с несозревшей аффинностью, производили окрашивание тетрамерами HLA-A\*02, содержащими COL6A3-002 (SEQ ID NO: 1), и доокрашивание смесью тетрамеров HLA-A\*02, содержащей 9 пептидов (SEQ ID NO: 28-36) с высоким сходством последовательностей с COL6A3-002. Стабилизированный scTv (SEQ ID NO 27) с последовательностью бета-цепи CDR1, с не созревшей аффинностью, RSGDLS (SEQ ID NO: 13) сравнивается с клонами scTv, имеющими последовательности бета-цепи CDR1 с созревшей аффинностью, AMDHPY (SEQ ID NO: 40) и ARWHRN (SEQ ID NO: 39).

На фиг. 3 представлены профили элюции, полученные методом эксклюзионной хроматографии для гибридных вариантов анти-CD3 Fab-scTv R4P3F9S с 75-1 по 75-25.

На фиг. 4 представлена кинетика связывания HLA-A\*02/COL6A3-002 с анти-CD3 Fab-scTv R4P3F9S в гибридных вариантах с 75-1 по 75-25, измеренная с помощью биослойной интерферометрии. Указаны проанализированные концентрации HLA-A\*02/COL6A3-002.

На фиг. 5 показан анализ связывания анти-CD3 Fab-scTv R4P3F9S в гибридных вариантах с 75-1 по 75-25 по измерениям с помощью биослойной интерферометрии (BLI). Анализировали 1 мкМ HLA-A\*02 в комплексе с указанными сходными пептидами.

На фиг. 6 представлено сравнение кинетики связывания HLA-A\*02/COL6A3-002 и HLA-A\*02/COL6A1-001 (SEQ ID NO: 30) с анти-CD3 Fab-scTv R4P3F9S в различных гибридных вариантах. Указаны проанализированные концентрации молекул Fab-scTv.

На фиг. 7 показано окрашивание меченными ФЭ тетрамерами HLA-A\*02/COL6A3-002 Т-клеток человека, экспрессирующих вариант ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью. Отсутствие ТКР (имитация) или экспрессию ТКР 1G4, специфичного к NYESO1-001, и окрашивание меченными ФЭ тетрамерами

HLA-A\*02/NYESO1-001 использовали в целях контроля.

На фиг. 8 показано высвобождение IFN-гамма у варианта ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью, экспрессируемого CD8<sup>+</sup> Т-клетками человека в ответ на COL6A3-002. В целях контроля ТКР не экспрессировали (имитация) или экспрессировали ТКР 1G4, специфичный к NYESO1-001. Высвобождение IFN-гамма определяли методом ELISA после совместного культивирования электропорированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток с клетками Т2, нагруженными серийными разведениями COL6A3-002.

На фиг. 9 показано высвобождение IFN-гамма у варианта ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью, экспрессируемого CD8<sup>+</sup> Т-клетками человека в ответ на COL6A3-002 и различные сходные пептиды. В целях контроля ТКР не экспрессировали (имитация) или экспрессировали ТКР 1G4, специфичный к NYESO1-001. Высвобождение IFN-гамма определяли методом ELISA после совместного культивирования электропорированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток с клетками Т2, нагруженными 10 мкМ COL6A3-002 или сходных пептидов.

На фиг. 10 показано окрашивание мечеными ФЭ тетрамерами пептид-HLA-A\*02 Т-клеток человека, экспрессирующих вариант ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью. В целях контроля ТКР не экспрессировали (имитация) или экспрессировали ТКР 1G4, специфичный к NYESO1-001, и проводили окрашивание мечеными ФЭ тетрамерами HLA-A\*02/NYESO1-001.

На фиг. 11 показано высвобождение IFN-гамма у варианта ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью, экспрессируемого CD8<sup>+</sup> Т-клетками человека в ответ на COL6A3-002 или COL6A1-001. В целях контроля ТКР не экспрессировали (имитация) или экспрессировали ТКР 1G4, специфичный к NYESO1-001. Высвобождение IFN-гамма определяли методом ELISA после совместного культивирования электропорированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток с клетками Т2, нагруженными серийными разведениями COL6A3-002 или COL6A1-001.

На фиг. 12 показано высвобождение IFN-гамма первичными CD8<sup>+</sup> Т-клетками человека, экспрессирующими варианты ТКР R4P3F9, после совместного культивирования с различными линиями опухолевых клеток. Т-клетки линий SF539, SW982 и Hs840 презентуют пептид-мишень на различных уровнях. Клетки MCF-7 не презентуют пептид-мишень. В качестве контролей анализировали эффекторные клетки без экзогенного ТКР вместе с клетками с исследуемым ТКР. Высвобождение IFN-гамма определяли методом ELISA. \* Отмечена точка вне масштаба.

Таблица 1

Последовательности пептида по изобретению (положения согласно нумерации IMGT (François Ehrenmann, Patrice Duroux, Chantal Ginestoux; Protein displays: human (Homo sapiens) TRAV; IMGT Repertoire. IMGT®, the international ImMunoGenetics information system® <http://www.imgt.org>; Создан: 16/03/2011. Версия: 03/06/2016; François Ehrenmann, Patrice Duroux, Chantal Ginestoux; Protein displays: human (Homo sapiens) TRBV; IMGT Repertoire. IMGT®, the international ImMunoGenetics information system® <http://www.imgt.org>; Создан: 16/03/2011. Версия: 03/06/2016.

SEQ ID NO	Название	Описание	Последовательность
1	COL6A3-002		FLLDGSANV
2	R4P3F9 альфа	ТКР R4P3F9, альфа-цепь - полной длины	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYSAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
3	R4P3F9, альфа, лидерный	ТКР R4P3F9, альфа-цепь - лидерный пептид	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ
4	R4P3F9, альфа, переменный	ТКР R4P3F9, альфа-цепь - переменный домен	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYSAGSYQLTFGKGTKLSVIP
5	R4P3F9, CDRa1	ТКР R4P3F9, альфа-цепь - CDR1	DRGSQS
6	R4P3F9, CDRa2	ТКР R4P3F9, альфа-цепь - CDR2	IYSNGD
7	R4P3F9, CDRa3	ТКР R4P3F9, альфа-цепь - CDR3	CAAYSAGSYQLT
8	R4P3F9 альфа, константный	ТКР R4P3F9, альфа-цепь - константный домен	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
9	R4P3F9 - альфа, константный, начало	ТКР R4P3F9, альфа-цепь - константный	NIQN

		домен, начало	
10	R4P3F9, бета	ТКР R4P3F9, бета-цепь – полной длины	MGFRLLCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLR CSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYNGEERAKGNILER FSAQQFPDLHSELNLSLELGDLSALYFCASSVSSYGYTFG SGTRLTVVEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFFPDHVELSWSVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKA TLYAVLVSAVLVLMAMVKKRDF
11	R4P3F9, бета, лидерный	ТКР R4P3F9, бета-цепь – лидерный пептид	MGFRLLCVAFCLLGAGPV
12	R4P3F9, бета, вариабель ный	ТКР R4P3F9, бета-цепь – вариабельны й домен	DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQ GLQFLIQYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLE LGDLSALYFCASSVSSYGYTFGSGTRLTVV
13	R4P3F9, CDRb1	ТКР R4P3F9, бета-цепь – CDR1	RSGDLS
14	R4P3F9, CDRb2	ТКР R4P3F9, бета-цепь – CDR2	YNGEE
15	R4P3F9, CDRb3	ТКР R4P3F9, бета-цепь – CDR3	CASSVSSYGYT
16	R4P3F9, бета, константн ый	ТКР R4P3F9, бета-цепь – константный домен	EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHV ELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTVIVSA EAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKKRDF
17	R4P3F9, бета, константн ый, начало 1	ТКР R4P3F9, бета-цепь – константный домен, начало 1	EDLNK
18	R4P3F9, бета, константн ый, начало 2	ТКР R4P3F9, бета-цепь – константный домен, начало 2	EDLKN
19	Aga2p – R4P3F9	Слитый белок Aga2p с scTv R4P3F9 и метками	MQLLRCSIFSVIASVLAQELTTICEQIPSPSTLESTPYSLS TTTTILANGKAMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPSTTSKGPIN TQYVFGGGSDYKDDDDKGGGASQKEVEQNSGPLSVPEGAI ASLNCTYSDRGSQSF FWYRQYSGKSP ELIMSIYNGDKEDG RFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYSAGAGSYQL TFGKGTKLSVIPNIQNGGGSGGGSGGGSGGGSGVTTQ PKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQ YNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDLSALY FCASSVSSYGYTFGSGTRLTVVEDLNKAAAGSGGEGQKLI SEEDL
20	Aga2p	Лидерная последовате льность и Aga2p	MQLLRCSIFSVIASVLAQELTTICEQIPSPSTLESTPYSLS TTTTILANGKAMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPSTTSKGPIN TQYVF
21	Метка FLAG	Метка FLAG плюс линкеры	GGGSDYKDDDDKGGGAS
22	scTv R4P3F9	Однопочеч ные вариабель-	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSF FWYRQYSG KSP ELIMSIYNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPS DSATYLCAAYSAGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGSGG

		ные домены R4P3F9 с линкером; аF55S в вариабельном домене альфа-цепи	GGSGGGGGGGSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDL SVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPD LHSELNLSLELGDSALYFCASSVSSYGYTFGSGTRLTVV EDLNK
23	Метка Мус	Линкер и метка Мус	AAAGGSGGEQKLISEEDL
24	scTv R4P3F9 - bQ43K	scTv R4P3F9 со стабилизирующей мутацией bQ43K в вариабельном домене бета-цепи	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSG KSPPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIIRDSQPS DSATYLCAAYSAGASYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGGSGG GGGGGGGGGGGSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDL SVYWYKQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPD LHSELNLSLELGDSALYFCASSVSSYGYTFGSGTRLTVV EDLNK
25	scTv R4P3F9 - bL72S	scTv R4P3F9 со стабилизирующей мутацией bL72S в вариабельном домене бета-цепи	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSG KSPPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIIRDSQPS DSATYLCAAYSAGASYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGGSGG GGGGGGGGGGGSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDL SVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPD LHSELNLSLELGDSALYFCASSVSSYGYTFGSGTRLTVV EDLNK
26	CDRa1 мутант1	Мутация aG29R	DRRSQS
27	scTv R4P3F9S	Стабилизирующая версия scTv R4P3F9	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRRSQSFFWYRQYSG KSPPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIIRDSQPS DSATYLCAAYSAGASYQLTFGKGTKLSVIPGGGGGGGGGSG GGGGGGGGGGGSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGD LSVYWYKQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNISERFSAQQFP DLHSELNLSLELGDSALYFCASSVSSYGYTFGSGTRLTVV
28	AGRN-001	Сходные пептиды	ALLDGRVQL
29	CLASP1-001	Сходные пептиды	RLLDGAFKL
30	COL6A1-001	Сходные пептиды	ILLDGSASV
31	COL6A2-001	Сходные пептиды	FLLDGSERL
32	COL6A3-006	Сходные пептиды	FLFDGSANLV
33	COL6A3-008	Сходные пептиды	FLFDGSANL
34	COL6A3-014	Сходные пептиды	FLLDGSEGV
35	VWA2-001	Сходные пептиды	FLLDGNSV
36	VWF-001	Сходные пептиды	FLLDGSSRL
37	CDRb1, мутант 1	Бета-цепь - CDR1, вариант 1	ARWHNN
38	CDRb1, мутант 2	Бета-цепь - CDR1 вариант 2	AKDHLN



39	CDRb1, мутант 3	Бета-цепь - CDR1, вариант 3	ARWHRN
40	CDRb1, мутант 4	Бета-цепь - CDR1 вариант 4	AMDHPY
41	CDRb1, мутант 5	Бета-цепь - CDR1 вариант 5	ATDHYN
42	CDRb1, мутант 6	Бета-цепь - CDR1 вариант 6	ARYHTN
43	CDRb1, мутант 7	Бета-цепь - CDR1 вариант 7	APYHLN
44	CDRb1, мутант 8	Бета-цепь - CDR1 вариант 8	AKDHTN
45	CDRb1, мутант 9	Бета-цепь - CDR1 вариант 9	ARYHRN
46	CDRb1, мутант 10	Бета-цепь - CDR1 вариант 10	ARWHSN
47	CDRb1, мутант 11	Бета-цепь - CDR1 вариант 11	ATDHYN
48	CDRb1, мутант 12	Бета-цепь - CDR1 вариант 12	RWGDLN
49	CDRb1, мутант 13	Бета-цепь - CDR1 вариант 13	ARDHLN
50	75-1	Тяжелая цепь Fab со стабилизиро ванным scTv R4P3F9S	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGYSFTGYTMNWVRQAPGKLEWVALINPKGVSTYNQKF KDRFTISVDKSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARSQYGGDS DWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKT HTSPSPAPPVAGQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDR GSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKAS QYVSLLRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKGTKLSV IPNIQNGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGVTQTPKHLI TATGQRVTLRCSFRSGLSVYWKQSLDQGLQFLIQYYNGE ERAKGNISERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDALYFCASS VESSYGYTFGSGTRLTVVEDLKN
51	75- Fab тяжелая цепь	Тяжелая цепь Fab	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGYSFTGYTMNWVRQAPGKLEWVALINPKGVSTYNQKF KDRFTISVDKSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARSQYGGDS DWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKT HTSPSPAPPVAG
52	75- Fab легкая цепь	Легкая цепь Fab	MKWVTFISLLFLFSSAYSIDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQDIRNYLNWYQKPKGKAPKLLIYYTSRLESQVPSRFSG SGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
53	1G4, альфа	ТКР 1G4, альфа-цепь	METLLGLLILWLQWVSSKQEVTVI PAALSVP EGENLVLN CSFTDSAINLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLN ASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVRPTSGGSIPTF

		- полной длины	GRGTSILVHPYIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQ TNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLNFQ NLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
54	1G4, альфа, лидерный	TKP 1G4, альфа-цепь - лидерный пептид	METLLGLLLWLQQLWVSSK
55	1G4, альфа, вариабель ный	TKP 1G4, альфа-цепь - вариабель- ный домен	QEVTVI PAALSVEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRDQPGK GLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLTKSSGRSTLYIAASQPG DSATYLCVAVRPTSGGSYIPTFFGRGTSILVHP
56	1G4, альфа, константн ый	TKP 1G4, альфа-цепь - константный домен	YIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSD VYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFA CANAFNNSI IPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRIL LLKVAGFNLLMTLRLWSS
57	1G4, бета	TKP 1G4, бета-цепь - полной длины	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKQGSMTLQ CAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVAGITDQGEVPNG YVNSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVNGTGELFF GEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFYPDHVELSWSVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCVQVQFYGLSENDEWTDRA KPVTVIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGK ATLYAVLVSAVLMAMVKKRDSRG
58	1G4, бета, лидерный	TKP 1G4, бета-цепь - лидерный пептид	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNA
59	1G4, бета, вариабель ный	TKP 1G4, бета-цепь - вариабель- ный домен	GVTQTPKFQVLKQGSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGL RLIHYSVAGITDQGEVPNGYVNSRSTTEDFPLRLLSAAPS QTSVYFCASSYVNGTGELFFGEGSRLTVL
60	1G4, бета, константн ый	Бета-цепь - константный домен	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHV ELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNP RNHFRCVQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTVIVSA EAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKKRDSRG
61	NYES01- 001	Контрольный пептид	SLLMWITQV
62	C-14, бета; C- 5, бета	Бета-цепь полной длины TKP C-14; C-5 с CDRb1, мутант 4	MGRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLR CSPAMDHPYVYVYQQSLDQGLQFLIQYNGEERAKGNILER FSAQQFPDLHSELNLSLELGDALYFCASSVSESYGYTFG SGTRLTVVEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFFPDHVELSWSVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCVQVQFYGLSENDEWTDRAK PVTVIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKA TLYAVLVSAVLMAMVKKRDF
63	C-14, альфа	C-14; TKP бета-цепь полной длины с CDRa1 мутант 1	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGFLSVPEGAIAS LNCTYSDRRSQSFFWYRQYSKGSPELIMFIYNSGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYSAGASYQLTF GKGTKLSVIPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQ TNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLNFQ NLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
64	75-5	Тяжелая цепь Fab со стабилизиро ванным sCtv R4P3F9S и	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS ASGYSFTGYTMNWVRQAPGKLEWVALINPYKGVSTYNQKF KDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSYYGDS DWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKT

		CDRb1 мутант 4	HTSPFPSAPPVAGQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDR GSQSFVWYRQYSGKSPPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKAS QYVSLIIRDSQPSDSATYLCAAYSAGAGSYQLTFGKGTKLSV IPNIQNGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG TATGQQRVTLRCSFAMDHPYVYWKQSLDQGLQFLIQYYNGE ERAKGNISERFSAQQFPDLHSELNLSLSELELGDALYFCASS VESSYGYTFPGSGTRLTVVDELKN
65	75-14	Тяжелая цепь Fab со стабилизиро ванным scTv R4P3F9S, CDR1, мутант 1, и CDRb1, мутант 4	MKWVTFISLLFLFSSAYSSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS ASGYSFTGYTMNWVRQAPGKLEWVALINPYKGVSTYNQKF KDRFTISVDKSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARSYYGDS DWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKT HTSPFPSAPPVAGQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDR RSQSFVWYRQYSGKSPPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKAS QYVSLIIRDSQPSDSATYLCAAYSAGAGSYQLTFGKGTKLSV IPNIQNGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG TATGQQRVTLRCSFAMDHPYVYWKQSLDQGLQFLIQYYNGE ERAKGNISERFSAQQFPDLHSELNLSLSELELGDALYFCASS VESSYGYTFPGSGTRLTVVDELKN
66	75-25	Тяжелая цепь Fab со стабилизиро ванным scTv R4P3F9S в бета/альфа- ориентации, CDR1, мутант 1	MKWVTFISLLFLFSSAYSSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS ASGYSFTGYTMNWVRQAPGKLEWVALINPYKGVSTYNQKF KDRFTISVDKSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARSYYGDS DWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKT HTSPFPSAPPVAGGVTVTPKHLITATGQQRVTLRCSFPRSGD SVYWKQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNISERFSAQQFPD LHSELNLSLSELELGDALYFCASSVESSYGYTFPGSGTRLTV EDLNKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG SVPEGAIASLNCTYSRRSQSFVWYRQYSGKSPPELIMSIYS NGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIIRDSQPSDSATYLCAAYS AGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQ

### Примеры

Встречающиеся в природе Т-клеточные рецепторы (ТКР) к раковым антигенам зачастую обладают более низкой аффинностью по сравнению с ТКР, направленными на вирусные антигены, и это может быть одним из возможных объяснений ускользания опухолевых клеток от иммунного надзора (Aleksic et al., 2012). Таким образом, желательно иметь варианты ТКР с более высокой аффинностью, разработанные для использования в качестве антигенраспознающих структур в адоптивной клеточной терапии, или же в качестве модуля распознавания в подходе на основе растворимых схем, например, с использованием биспецифических молекул (Hickman et al., 2016). Настоящее изобретение, таким образом, относится к модификации и оптимизации встречающегося в природе Т-клеточного рецептора R4P3F9 (SEQ ID NO: 2 и 10), мишенью которого является опухолеассоциированный пептид COL6A3-002 (SEQ ID NO: 1) с аффинностью около 60 мкМ (DE102016115246).

Пример 1. Получение стабильных scTv.

Для целей настоящего изобретения ранее исследованный ТКР R4P3F9 (SEQ ID NO: 2 и 10) был преобразован в одноцепочечную ТКР-структуру (scTv, SEQ ID NO: 22) для созревания по технологии поверхностного дисплея на основе дрожжей при помощи комбинации варибельного альфа- (SEQ ID NO: 4) и бета- (SEQ ID NO: 12) домена с дополнениями в виде соответствующих константных доменов (SEQ ID NO: 9 и 17) и подходящей глицин-сериновой линкерной последовательности. ДНК соответствующей последовательности была синтезирована и трансформирована в *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 (МАТа AGA1::GAL1AGA1::URA3 ura352 trp1 leu2delta200 his3delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL) (ATCC® MYA 4941™) вместе с вектором дрожжевого дисплея, содержащим лидерную последовательность и белок Aga2p, определяющий тип спаривания у дрожжей (SEQ ID NO: 20), на основе pCT302 (Boder et al., 2000). Полученный в результате слитый белок после гомологичной рекомбинации в дрожжевых клетках (SEQ ID NO: 19) содержит лидерный пептид на N-конце белка Aga2p, отвечающего за экспонирование исследуемого белка (Boder et al., 1997), короткие пептидные метки, включающие линкерные последовательности (SEQ ID NO: 21 и 23) в целях экспрессии контролей и исследуемого белка, а именно scTv R4P3F9 (SEQ ID NO: 22) или его варианты. Трансформацию производили согласно описанию в заявке DE 102016121899 с получением в результате вплоть до  $10^9$  дрожжевых клонов на библиотеку. Библиотеки были получены за счет случайного мутагенеза при ПЦР, охватывая целиком последовательность генов scTv R4P3F9.

Процесс отбора дрожжевых клонов с лучшим экспрессирующимся scTv, который селективно связывается с COL6A3-002 при участии HLA-A\*02, производили в сущности согласно описанию в работе Smith et al., 2015. В целях подтверждения высокого уровня экспрессии и правильной конформации варианта scTv R4P3F9, экспонированного на поверхности дрожжей, использовали антитело к Vbeta1 (Beckman Coulter, клон BL37.2) вместе с тетрамером HLA-A\*02/COL6A3-002 (фиг. 1). Преобразование scTv с помощью поверхностного дисплея на основе дрожжей обнаружило две ключевые стабилизирующие мутации в каркасном участке, необходимом вместе с исходными последовательностями CDR для надлежащей презентации scTv на клеточной поверхности, а именно bQ43K (SEQ ID NO: 24) и bL72S (SEQ ID NO: 25), обе из которых расположены на бета-цепи. Кроме того, во время созревания стабиль-

ности в положении 29 в CDR1 альфа-цепи (SEQ ID NO: 5) было сделано преобразование: глицин в аргинин (мутант 1 CDRa1, SEQ ID NO: 26), что привело к улучшенному связыванию с тетрамером.

Пример 2. Созревание аффинности стабилизированных scTv.

В целях получения молекул scTv с более высокой аффинностью связывания по отношению к HLA-A\*02/COЛ6A3-002 производили вырождение CDRb1 (SEQ ID NO: 13) с использованием предварительно идентифицированного стабилизированного каркаса scTv R4P3F9S (SEQ ID NO: 27), экспрессирующего стабилизирующие мутации aG29R, bQ43K и bL72S. Остатки CDRb1 рандомизировали с помощью вырожденных олигонуклеотидных праймеров ДНК, по существу, как было описано ранее (Smith et al., 2015). Полученную в результате ДНК-библиотеку трансформировали согласно описанию примера 1. Чтобы сохранить селективность связывания scTv, негативный отбор использовали против тетрамеров HLA-A\*02, включающих пептиды, полученные из нормальных тканей (SEQ ID NO: 28-36), которые обладают высоким сходством последовательности с пептидом COЛ6A3-002.

Чтобы произвести отбор вариантов scTv R4P3F9S с увеличенной аффинностью и селективностью, использовали тетрамер HLA-A\*02/COЛ6A3-002 со снижением концентраций для каждого этапа сортировки. После трех этапов отбора выделяли и секвенировали отдельные клоны scTv, получая в результате ряд последовательностей CDRb1 с созревшей аффинностью (SEQ ID NO: 37 по 49). Для scTv с последовательностями CDRb1 с созревшей аффинностью, могло быть продемонстрировано сильное улучшение способности связывания с COЛ6A3-002, тогда как селективность связывания с COЛ6A3-002 сохранялась, поскольку связывания для 9 сходных пептидов не наблюдалось (фиг. 2).

Пример 3. Производство слитых белков "биспецифическое антитело-scTv".

Стабилизированный scTv с созревшей аффинностью к HLA-A\*02/COЛ6A3-002 может быть экспрессирован в слитой форме с фрагментом антитела к CD3, делая возможным опухолеспецифическое перенаправление на мишень и активацию Т-клеток вне зависимости от их природной специфичности. Авторы изобретения получили слитые белки "биспецифическое антитело-ТКР", включающие тяжелую цепь антитела с анти-CD3 Fab-фрагментом (UCHT1) (SEQ ID NO: 51), слитую с вариантами scTv R4P3F9S (SEQ ID NO: 50, 64, 65 и 66) и легкую цепь антитела с анти-CD3 Fab-фрагментом (UCHT1) (SEQ ID NO: 52). Полученные в результате слитые белки Fab-scTv обладают молекулярной массой приблизительно 75 кДа. На основании различных CDR1-последовательностей scTv R4P3F9S альфа- (SEQ ID NO: 5 и 26) и бета-цепи (SEQ ID NO: 13 и 37-49) различные варианты слияния Fab-scTv (75-1 по 75-25, табл. 2) были экспрессированы в транзиторно трансфицированные клетки Exp1CHO согласно рекомендациям производителя. Белки были очищены с помощью хроматографии с белком L и эксклюзионной хроматографии. Все варианты слияния могли быть получены с выходом в диапазоне от 80 мкг вплоть до 1 мг (табл. 2) и гетеродимерами однородной формы ожидаемого размера согласно результатам анализа с помощью эксклюзионной хроматографии (фиг. 3).

Таблица 2

Номенклатура и выход слитых белков "биспецифический Fab-scTv".  
В основе молекулы лежат последовательности SEQ ID NO 50 и 52 и указанные варианты CDRa1 и CDRb1

Вариант	CDRa1/SEQ	CDRb1/SEQ	Выход [мг]
75-1	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	RSGDLS (SEQ ID NO. 13)	267,9
75-2	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ARWHNN (SEQ ID NO. 37)	78,4
75-3	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	AKDHLN (SEQ ID NO. 38)	646,7
75-4	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ARWHRN (SEQ ID NO. 39)	704,3
75-5	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	AMDHPY (SEQ ID NO. 40)	397,2
75-6	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ATDHYN (SEQ ID NO. 41)	268,1
75-7	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ARYHTN (SEQ ID NO. 42)	83,2
75-8	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	APYHLN (SEQ ID NO. 43)	765,7
75-9	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	AKDHTN (SEQ ID NO. 44)	1067,2
75-10	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	RSGDLS (SEQ ID NO. 13)	389,6
75-11	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARWHNN (SEQ ID NO. 37)	270,4
75-12	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	AKDHLN (SEQ ID NO. 38)	943,6
75-13	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARWHRN (SEQ ID NO. 39)	560,3
75-14	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	AMDHPY (SEQ ID NO. 40)	360,7
75-15	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ATDHYN (SEQ ID NO. 41)	541,5
75-16	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARYHTN (SEQ ID NO. 42)	403,6
75-17	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	APYHLN (SEQ ID NO. 43)	195,5
75-18	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	AKDHTN (SEQ ID NO. 44)	731,3
75-19	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARYHRN (SEQ ID NO. 45)	794
75-20	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARWHSN (SEQ ID NO. 46)	85,5
75-21	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ATDHYN (SEQ ID NO. 47)	276
75-22	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	RWGDLN (SEQ ID NO. 48)	255
75-23	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARDHLN (SEQ ID NO. 49)	217
75-24 <sup>a</sup>	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	RSGDLS (SEQ ID NO. 13)	166,6
75-25 <sup>a</sup>	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	RSGDLS (SEQ ID NO. 13)	267

<sup>a</sup> Бета-альфа-ориентация scTv.

Пример 4. Связывание слитых белков Fab-scTv с COL6A3-002 и сходными пептидами.

Аффинность связывания слитых белков анти-CD3-scTv R4P3F9S по отношению к мономерам HLA-A\*02 с пептидом COL6A3-002 или различными сходными пептидами измеряли с помощью биослойной интерферометрии. Измерения проводили на системе Octet RED384 с использованием настроек, рекомендованных производителем. Вкратце, очищенные молекулы Fab-scTv загружали на биосенсоры (FAB2G) до проведения анализа серийных разведений HLA-A\*02/COL6A3-002. В сравнении с вариантами 75-1 и 75-24, включающими CDRa1 дикого типа и CDRb1 дикого типа, для вариантов Fab-scTv с последовательностями CDRa1 и/или CDRb1 с созревшей аффинностью наблюдалось повышение уровня аффинности связывания вплоть до 40 раз (табл. 3, фиг. 4). В целях оценки селективности связывания с HLA-A\*02/COL6A3-002 проводили скрининг очищенных молекул Fab-scTv, нагруженных на биосенсоры FAB2G, относительно связывания с 1 мкМ сходных пептидов (SEQ ID NO: 28-36), каждый из которых был в комплексе с HLA-A\*02. За исключением HLA-A\*02/COL6A1-001 (SEQ ID NO: 30), с которым связывалось большинство вариантов Fab-scTv, содержащих зрелый CDRa1 с созревшей аффинностью (SEQ ID NO: 26), варианты Fab-scTv не продемонстрировали связывания со сходными пептидами (фиг. 5), что свидетельствует о высокой селективности связывания. Для некоторых вариантов Fab-scTv проводили исследование терапевтического окна между связыванием с HLA-A\*02/COL6A3-002 и HLA-A\*02/COL6A1-001, нагружая биотинилированные комплексы пептид-HLA на биосенсоры (SA) и анализируя серийные разведения вариантов Fab-scTv. Тогда как аффинность связывания варианта 75-10, включающего последовательность CDRa1 (SEQ ID NO: 26) с созревшей аффинностью и последовательность дикого типа CDRb1 (SEQ ID NO: 13), была в 8 раз выше с HLA-A\*02/COL6A3-002, чем с HLA-A\*02/COL6A1-001, аффинность связывания, выявленная для варианта 75-13 Fab-scTv, включающего CDRb1 (SEQ ID NO: 39), обладающий зрелостью, была вплоть до 57 раз выше, что подтверждает улучшение терапевтического окна (табл. 4, фиг. 6).

Таблица 3

Аффинность связывания слитых белков Fab-scTv  
с HLA-A\*02/COL6A3-002

Вариант	KD (M)	kon (1/Mc)	koff (1/c)
75-1	8,06E-06	1,01E+05	8,17E-01
75-2	3,69E-06	1,59E+05	5,86E-01
75-3	4,92E-06	9,71E+04	4,78E-01
75-4	5,76E-06	9,78E+04	5,63E-01
75-5	4,32E-04	2,21E+03	9,55E-01
75-6	1,13E-06	2,06E+05	2,32E-01
75-7	1,79E-06	1,93E+05	3,44E-01
75-8	3,45E-06	1,36E+05	4,69E-01
75-9	1,41E-05	6,02E+04	8,51E-01
75-10	1,78E-06	1,69E+05	3,01E-01
75-11	2,82E-07	4,16E+05	1,18E-01
75-12	3,74E-07	2,67E+05	1,00E-01
75-13	4,05E-07	3,28E+05	1,33E-01
75-14	3,10E-06	8,41E+04	2,61E-01
75-15	7,78E-07	2,33E+05	1,81E-01
75-16	5,87E-07	3,37E+05	1,98E-01
75-17	2,27E-07	3,62E+05	8,20E-02
75-18	1,93E-06	1,51E+05	2,91E-01
75-19	6,00E-07	2,96E+05	1,78E-01
75-20	5,31E-07	6,08E+05	3,23E-01
75-21	5,52E-07	2,72E+05	1,50E-01
75-22	8,22E-07	2,48E+05	2,04E-01
75-23	3,24E-07	3,18E+05	1,03E-01
75-24	5,20E-06	1,08E+05	5,62E-01
75-25	8,33E-06	6,23E+04	5,19E-01

Таблица 4

Сравнительные аффинности связывания слитых белков Fab-scTv с HLA-A\*02/COL6A3-002 и HLA-A\*02/COL6A1-001

Вариант	pHLA-A*02	KD (M)	KD <sub>COL6A1-001</sub> /KD <sub>COL6A3-002</sub>
75-10	COL6A3-002	1,37E-05	8
	COL6A1-001	1,08E-04	
75-11	COL6A3-002	8,50E-07	8
	COL6A1-001	6,46E-06	
75-12	COL6A3-002	7,24E-07	12
	COL6A1-001	8,98E-06	
75-13	COL6A3-002	7,39E-07	57
	COL6A1-001	4,23E-05	
75-17	COL6A3-002	8,25E-07	9
	COL6A1-001	7,10E-06	
75-23	COL6A3-002	1,15E-06	22
	COL6A1-001	2,55E-05	

Пример 5. Применение ТКР, обладающих созревшей аффинностью, для клеточной экспрессии.

Модификация Т-клеток в целях экспрессии ТКР, распознающих комплекс опухолеспецифический пептид-HLA, является многообещающей альтернативой для перенаправления Т-клеток на раковые клетки. Поскольку использование последовательностей CDR1 с созревшей аффинностью могло улучшить связанные с клетками ТКР к HLA-A\*02/COL6A3-002, идентифицированные последовательности CDRa1 и CDRb1 с мутациями вводили в исходный ТКР R4P3F9 (SEQ ID NO: 2 и 10). Полученные варианты ТКР с мутациями (с C-1 по C-18, табл. 5) экспрессировали в CD8<sup>+</sup> Т-клетках человека после электропорации соответствующей мРНК, полученной за счет транскрипции *in vitro* амплифицированных путем ПЦР конструкций ДНК. В целях контроля производили экспрессию ТКР 1G4 (SEQ ID NO: 53 и 57) к пептиду NYESO1-001 (SEQ ID NO: 61). После инкубации в течение ночи РНК-электропорированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток экспрессию введенных вариантов ТКР анализировали с помощью окрашивания ФЭ-мечеными тетрамерами HLA-A\*02/COL6A3-002 или тетрамерами HLA-A\*02/NYESO1-001. Тогда как исходный ТКР R4P3F9, вариант C-1 демонстрировал только минимальное окрашивание тетрамерами HLA-A\*02/COL6A3-002, варианты ТКР R4P3F9 с C-2 по C-18 с CDRa1 и/или CDRb1 с созревшей аффинностью демонстрировали повышенное тетрамерное окрашивание (фиг. 7). Функциональную активацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток (20000 клеток/лунка), экспрессирующих различные варианты ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью исследовали путем определения уровней высвобождаемого IFN-гамма после совместной культивации с T2 клетками (20 000 клеток/лунка), нагруженных либо серийными разведениями COL6A3-002 (SEQ ID NO: 1), либо 10 мкМ COL6A3-002 и сходных пептидов (SEQ ID NO: 28-36). По сравнению с исходным ТКР R4P3F9, вариантом C-1, ТКР-варианты с C-2 по C-18 с созревшей аффинностью демонстрировали повышенное высвобождение IFN-гамма с достижением максимальных уровней уже при более низких концентрациях пептида (фиг. 8). Как и ожидалось, высвобождения IFN-гамма не наблюдалось в случае Т-клеток, не экспрессирующих ТКР, или экспрессирующих контрольный ТКР 1G4, специфичный к NYESO1-001. Чтобы проанализировать селективность распознавания COL6A3-002 вариантами ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью, проводили анализ высвобождения IFN-гамма в ответ на T2-клетки, нагруженные различными сходными пептидами (SEQ ID NO: 28-36), выявив различные профили селективности для вариантов ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью. Наиболее интересно отметить, что ТКР-варианты C-5 (SEQ ID NO: 62 и 2) и C-14 (SEQ ID NO: 62 и 63), включающие одинаковые CDRb1 (SEQ ID NO: 40) с созревшей аффинностью, не продемонстрировали никакого перекрестного взаимодействия с COL6A1-001 или другими сходными пептидами (фиг. 9), делая ТКР R4P3F9 варианты с созревшей аффинностью C-5 и C14 наиболее многообещающими кандидатами для адресного внутриклеточного нацеливания на опухоли на основе ТКР.

Таблица 5

Номенклатура клеточных вариантов ТКР. В основе молекулы лежат последовательности SEQ ID NO: 2 и 10 и указанные варианты CDRa1 и CDRb1

Вариант	CDRa1	CDRb1
C-1	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	RSGDLS (SEQ ID NO. 13)
C-2	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ARWHNN (SEQ ID NO. 37)
C-3	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	AKDHLN (SEQ ID NO. 38)
C-4	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ARWHRN (SEQ ID NO. 39)
C-5	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	AMDHPY (SEQ ID NO. 40)
C-6	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ATDHYN (SEQ ID NO. 41)
C-7	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ARYHTN (SEQ ID NO. 42)
C-8	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	APYHLN (SEQ ID NO. 43)
C-9	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	AKDHTN (SEQ ID NO. 44)
C-10	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	RSGDLS (SEQ ID NO. 13)
C-11	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARWHNN (SEQ ID NO. 37)
C-12	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	AKDHLN (SEQ ID NO. 38)
C-13	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARWHRN (SEQ ID NO. 39)
C-14	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	AMDHPY (SEQ ID NO. 40)
C-15	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ATDHYN (SEQ ID NO. 41)
C-16	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARYHTN (SEQ ID NO. 42)
C-17	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	APYHLN (SEQ ID NO. 43)
C-18	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	AKDHTN (SEQ ID NO. 44)

Пример 6. Окно распознавания COL6A3-002 и COL6A1-001 вариантами клеточных ТКР.

Клеточную экспрессию и анализ вариантов R4P3F9 производили, как описано выше. В соответствии с предшествующими экспериментами (фиг. 7) уровень окрашивания Т-клеток, экспрессирующих ТКР R4P3F9 варианты с C-2 по C-18, мечеными ФЭ тетрамерами HLA-A\*02/COL6A3-002, был выше в сравнении с исходным ТКР C-1. Кроме того, ТКР-варианты C-12 и C-17 демонстрировали связывание с HLA-A\*02/COL6A1-001 (фиг. 10). Экспрессия всех вариантов R4P3F9 с созревшей аффинностью улучшила функциональную активацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток в ответ на Т2-клетки, нагруженные серийными разведениями COL6A3-002 (SEQ ID NO: 1), с достижением значений EC<sub>50</sub> в 5-90 раз ниже, чем в случае исходного ТКР C-1 (фиг. 11, табл. 6). Наиболее низкий уровень EC<sub>50</sub> был зафиксирован для варианта C-14. Опять же, ТКР-варианты C-5 (SEQ ID NO: 62 и 2) и C-14 (SEQ ID NO: 62 и 63), включающие тот же самый CDRb1 (SEQ ID NO: 40) с созревшей аффинностью, не продемонстрировали никакого перекрестного взаимодействия по отношению к COL6A1-001, тогда как другие варианты демонстрировали сильное распознавание с окнами EC<sub>50</sub> (COL6A3-002 в сравнении с COL6A1-001) на таком низком уровне, который соответствует множителю 5.

Таблица 6

Значения EC<sub>50</sub> [нМ] высвобождения IFN-γ Т-клетками, экспрессирующими варианты R4P3F9, после совместного культивирования с Т2-клетками, нагруженными COL6A3-002 или COL6A1-001

Вариант	EC <sub>50</sub> для COL6A3-002 [нМ]	EC <sub>50</sub> для COL6A1-001 [нМ]
C-1	2,51	-
C-2	0,16	-
C-3	0,14	871 <sup>a</sup>
C-4	0,13	-
C-5	0,15	-
C-6	0,48	-
C-7	0,29	-
C-8	0,20	350
C-9	0,55	-
C-10	0,32	1,5
C-11	0,32	8,2
C-12	0,20	1,9
C-13	0,23	9,7
C-14	0,03	-
C-15	0,31	69
C-16	0,34	78
C-17	0,33	4,1
C-18	0,14	280089 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Уровень плато не достигнут.

Пример 7. Эффективность вариантов R4P3F9 C-5 и C-14 с созревшей аффинностью на линиях опухолевых клеток.

Клеточную экспрессию и анализ вариантов R4P3F9 производили, как описано выше. Экспрессия вариантов R4P3F9C-5 (SEQ ID NO: 62 и 2) и C-14 (SEQ ID NO: 62 и 63) с созревшей аффинностью улучшила функциональную активацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток в ответ на линии опухолевых клеток, презентующие COL6A3-002 (SEQ ID NO: 1), в сравнении с исходным ТКР C-1 (фиг. 12). Линии опухолевых клеток, ис-

пользованных во время этого исследования, презентуют различные количества пептида-мишени. Клетки SF539 имеют ~4000 копий HLA-A\*02/COЛ6A3-002 на клетку и клетки SW982 имеют ~460 копий на клетку. Тогда как исходный ТКР С-1 не опосредовал сильной активации Т-клеток после совместного культивирования с мишень-положительными клеточными линиями, вариант ТКР С-14 демонстрировал еще более сильное улучшение функциональной активации, чем вариант ТКР С-5. Эти данные сопоставимы с улучшением EC<sub>50</sub>, от ТКР С-1 к С-5 и к С-14 (табл. 6). Мишень-отрицательная клеточная линия MCF-7 не распознавалась ни одним из данных ТКР.

#### Литература:

- Aleksic et al. 2012: Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors – implications for therapeutic strategies, *Eur J Immunol.* 2012 Dec;42(12):3174-9;
- Hickman et al. 2016: Antigen Selection for Enhanced Affinity T-Cell Receptor-Based Cancer Therapies, *J Biomol Screen.* 2016 Sep;21(8):769-85;
- Boder and Wittrup 2000: Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, *Methods Enzymol.* 2000;328:430-44;
- Boder and Wittrup 1997: Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, *Nat Biotechnol.* 1997 Jun;15(6):553-7;
- Smith et al. 2015: T Cell Receptor Engineering and Analysis Using the Yeast Display Platform, *Methods Mol Biol.* 2015;1319:95-141;
- DE102016121899.5
- DE102016115246

#### Перечень последовательностей

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> НОВЫЕ ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДАМИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ИММУННАЯ ТЕРАПИЯ С ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

<130> I33054WO

<150> DE 102017125888.4

<151> 2017-11-06

<150> US 62/582,202

<151> 2017-11-06

<160> 66

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val  
1 5

<210> 2

<211> 274

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2



## 043746

Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu  
 20 25 30  
 Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp  
 35 40 45  
 Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser  
 50 55 60  
 Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly  
 65 70 75 80  
 Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu  
 85 90 95  
 Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala  
 100 105 110  
 Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys  
 115 120 125  
 Leu Ser Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln  
 130 135 140  
 Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp  
 145 150 155 160  
 Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr  
 165 170 175  
 Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser  
 180 185 190  
 Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn  
 195 200 205  
 Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro  
 210 215 220  
 Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp  
 225 230 235 240  
 Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu  
 245 250 255

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp  
 260 265 270

Ser Ser

<210> 3  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser  
 1 5 10 15

Trp Val Trp Ser Gln  
 20

<210> 4  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

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

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser  
 20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met  
 35 40 45

Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln  
 50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln  
 65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Tyr Ser Gly Ala Gly  
 85 90 95

Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro  
 100 105 110

<210> 5  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

Asp Arg Gly Ser Gln Ser  
1 5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Tyr Ser Asn Gly Asp  
1 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

Cys Ala Ala Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr  
1 5 10

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr  
20 25 30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr  
35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala  
50 55 60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser  
65 70 75 80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp  
85 90 95

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe  
100 105 110

043746

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala  
 115 120 125

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
 130 135 140

<210> 9  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Asn Ile Gln Asn  
 1

<210> 10  
 <211> 308  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Gly Phe Arg Leu Leu Cys Cys Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

Gly Pro Val Asp Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr  
 20 25 30

Ala Thr Gly Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp  
 35 40 45

Leu Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe  
 50 55 60

Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu  
 65 70 75 80

Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn  
 85 90 95

Leu Ser Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser  
 100 105 110

Ser Val Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu  
 115 120 125

Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
 130 135 140

043746

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
 145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
 165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln  
 180 185 190

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
 195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
 210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
 225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
 245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly  
 260 265 270

Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
 275 280 285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
 290 295 300

Arg Lys Asp Phe  
 305

<210> 11  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Met Gly Phe Arg Leu Leu Cys Cys Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

Gly Pro Val

<210> 12  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

043746

<400> 12

Asp Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp Leu Ser Val  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln  
35 40 45

Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu Glu Arg Phe  
50 55 60

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

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Val Glu  
85 90 95

Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Val  
100 105 110

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Ser Gly Asp Leu Ser  
1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Tyr Asn Gly Glu Glu  
1 5

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr  
1 5 10

## 043746

<210> 16  
 <211> 177  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro  
 1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu  
 20 25 30

Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn  
 35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys  
 50 55 60

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu  
 65 70 75 80

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys  
 85 90 95

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp  
 100 105 110

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

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser  
 130 135 140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala  
 145 150 155 160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp  
 165 170 175

Phe

<210> 17  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Asp Leu Asn Lys  
1 5

<210> 18  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 18

Glu Asp Leu Lys Asn  
1 5

<210> 19  
<211> 374  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val  
1 5 10 15

Leu Ala Gln Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr  
20 25 30

Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn  
35 40 45

Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe  
50 55 60

Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro  
65 70 75 80

Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp  
85 90 95

Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly Ala Ser Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn  
100 105 110

Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys  
115 120 125

Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr  
130 135 140

Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp  
145 150 155 160

Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr



## 043746

                  165  170  175

Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr  
                  180  185  190

Leu Cys Ala Ala Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly  
                  195  200  205

Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly  
                  210  215  220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
225  230  235  240

Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly Gln  
                  245  250  255

Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp Leu Ser Val Tyr  
                  260  265  270

Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr  
                  275  280  285

Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu Glu Arg Phe Ser  
                  290  295  300

Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu  
305  310  315  320

Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser  
                  325  330  335

Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu  
                  340  345  350

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

Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
                  370

<210> 20  
<211> 87  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val

## 043746

1                    5                    10                    15  
 Leu Ala Gln Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr  
                   20                    25                    30  
 Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn  
                   35                    40                    45  
 Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe  
                   50                    55                    60  
 Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro  
 65                    70                    75                    80  
 Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe  
                   85

<210> 21  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly  
 1                    5                    10                    15

Ala Ser

<210> 22  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 22

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

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser  
                   20                    25                    30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met  
                   35                    40                    45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln  
                   50                    55                    60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln  
 65                    70                    75                    80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Tyr Ser Gly Ala Gly  
85 90 95

Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro  
100 105 110

Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His  
130 135 140

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

Ser Gly Asp Leu Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly  
165 170 175

Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly  
180 185 190

Asn Ile Leu Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser  
195 200 205

Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe  
210 215 220

Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly  
225 230 235 240

Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys  
245 250

<210> 23  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu  
1 5 10 15

Asp Leu

<210> 24  
<211> 251

## 043746

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 24

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

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser  
 20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met  
 35 40 45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln  
 50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln  
 65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Tyr Ser Gly Ala Gly  
 85 90 95

Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro  
 100 105 110

Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His  
 130 135 140

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

Ser Gly Asp Leu Ser Val Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Gly  
 165 170 175

Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly  
 180 185 190

Asn Ile Leu Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser  
 195 200 205

Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe  
 210 215 220

Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly  
 225 230 235 240

Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys  
 245 250

<210> 25  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 25

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

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser  
 20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met  
 35 40 45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln  
 50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln  
 65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Tyr Ser Gly Ala Gly  
 85 90 95

Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro  
 100 105 110

Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His  
 130 135 140

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

Ser Gly Asp Leu Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly  
 165 170 175

Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly  
 180 185 190

Asn Ile Ser Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser  
 195 200 205

## 043746

Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe  
 210 215 220

Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly  
 225 230 235 240

Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys  
 245 250

<210> 26  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Arg Arg Ser Gln Ser  
 1 5

<210> 27  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 27

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

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Arg Ser Gln Ser  
 20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met  
 35 40 45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln  
 50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln  
 65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Tyr Ser Gly Ala Gly  
 85 90 95

Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro  
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125

043746

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys  
130 135 140

His Leu Ile Thr Ala Thr Gly Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro  
145 150 155 160

Arg Ser Gly Asp Leu Ser Val Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Leu Asp Gln  
165 170 175

Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys  
180 185 190

Gly Asn Ile Ser Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His  
195 200 205

Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr  
210 215 220

Phe Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser  
225 230 235 240

Gly Thr Arg Leu Thr Val Val  
245

<210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Leu Leu Asp Gly Arg Val Gln Leu  
1 5

<210> 29  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Leu Leu Asp Gly Ala Phe Lys Leu  
1 5

<210> 30  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 30

Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ala Ser Val

1 5

<210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Glu Arg Leu  
 1 5

<210> 32  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu Val  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu  
 1 5

<210> 34  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Glu Gly Val  
 1 5

<210> 35  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Asn Ser Val  
 1 5

<210> 36  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens



<400> 36

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu  
1 5

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Ala Arg Trp His Asn Asn  
1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Ala Lys Asp His Leu Asn  
1 5

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ala Arg Trp His Arg Asn  
1 5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Ala Met Asp His Pro Tyr  
1 5

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Ala Thr Asp His Tyr Asn  
1 5

<210> 42

<211> 6

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 42

Ala Arg Tyr His Thr Asn  
1 5

<210> 43  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Pro Tyr His Leu Asn  
1 5

<210> 44  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Lys Asp His Thr Asn  
1 5

<210> 45  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Arg Tyr His Arg Asn  
1 5

<210> 46  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Arg Trp His Ser Asn  
1 5

<210> 47  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Thr Asp His Tyr Asn  
1 5

<210> 48  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 48

Arg Trp Gly Asp Leu Asn  
 1 5

<210> 49  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Ala Arg Asp His Leu Asn  
 1 5

<210> 50  
 <211> 514  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 50

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
 1 5 10 15

Tyr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 20 25 30

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly  
 35 40 45

Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 50 55 60

Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys  
 65 70 75 80

Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala  
 85 90 95

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 100 105 110

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val  
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

043746

130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val  
 245 250 255

Ala Gly Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro  
 260 265 270

Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser  
 275 280 285

Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu  
 290 295 300

Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr  
 305 310 315 320

Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp  
 325 330 335

Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Tyr Ser Gly  
 340 345 350

Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val  
 355 360 365

Ile Pro Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 370 375 380

043746

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
385 390 395 400

Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly Gln Arg Val  
405 410 415

Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp Leu Ser Val Tyr Trp Tyr  
420 425 430

Lys Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn  
435 440 445

Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Ser Glu Arg Phe Ser Ala Gln  
450 455 460

Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu Glu Leu  
465 470 475 480

Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser Tyr  
485 490 495

Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu  
500 505 510

Lys Asn

<210> 51  
<211> 258  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 51

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
1 5 10 15

Tyr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
20 25 30

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly  
35 40 45

Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
50 55 60

Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys  
65 70 75 80

043746

Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala  
85 90 95

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
100 105 110

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val  
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val  
245 250 255

Ala Gly

<210> 52  
<211> 232  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 52

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
1 5 10 15

Tyr Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser  
20 25 30

## 043746

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg  
 35 40 45

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
 50 55 60

Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
 85 90 95

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu  
 100 105 110

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val  
 115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys  
 130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
 145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
 165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
 180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
 210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 53  
 <211> 274  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 53

Met Glu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Gln Leu Gln Trp  
 1 5 10 15

043746

Val Ser Ser Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val  
 20 25 30

Pro Glu Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala  
 35 40 45

Ile Tyr Asn Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr  
 50 55 60

Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg  
 65 70 75 80

Leu Asn Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile  
 85 90 95

Ala Ala Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg  
 100 105 110

Pro Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser  
 115 120 125

Leu Ile Val His Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln  
 130 135 140

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp  
 145 150 155 160

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr  
 165 170 175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser  
 180 185 190

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn  
 195 200 205

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro  
 210 215 220

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp  
 225 230 235 240

Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu  
 245 250 255

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp  
 260 265 270



Ser Ser

<210> 54  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 54

Met Glu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Gln Leu Gln Trp  
 1 5 10 15

Val Ser Ser Lys  
 20

<210> 55  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 55

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

Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn Leu  
 20 25 30

Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu Leu  
 35 40 45

Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala Ser  
 50 55 60

Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Ala Ala Ser Gln  
 65 70 75 80

Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser Gly  
 85 90 95

Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His  
 100 105 110

Pro

<210> 56  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

043746

<400> 56

Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr  
20 25 30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr  
35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala  
50 55 60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser  
65 70 75 80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp  
85 90 95

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe  
100 105 110

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala  
115 120 125

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
130 135 140

<210> 57

<211> 311

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala  
1 5 10 15

Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu  
20 25 30

Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His  
35 40 45

Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu  
50 55 60

Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro

043746

65				70						75							80
Asn	Gly	Tyr	Asn	Val	Ser	Arg	Ser	Thr	Thr	Glu	Asp	Phe	Pro	Leu	Arg		
				85					90					95			
Leu	Leu	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ser		
			100					105					110				
Ser	Tyr	Val	Gly	Asn	Thr	Gly	Glu	Leu	Phe	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Arg		
		115					120					125					
Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala		
	130					135					140						
Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr		
145					150					155					160		
Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser		
				165					170					175			
Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro		
			180					185					190				
Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu		
		195					200					205					
Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn		
	210					215					220						
His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu		
225					230					235					240		
Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu		
				245					250					255			
Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln		
			260					265					270				
Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala		
		275					280					285					
Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val		
	290					295					300						
Lys	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly											
305					310												

<210> 58  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala  
 1 5 10 15

Gly Pro Val Asn Ala  
 20

<210> 59  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 59

Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly Gln Ser  
 1 5 10 15

Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met Ser Trp  
 20 25 30

Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr Ser Val  
 35 40 45

Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr Asn Val  
 50 55 60

Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser Ala Ala  
 65 70 75 80

Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Val Gly Asn  
 85 90 95

Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

<210> 60  
 <211> 179  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 60

Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro  
 1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu  
 20 25 30

Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn  
 35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys  
 50 55 60

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu  
 65 70 75 80

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys  
 85 90 95

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp  
 100 105 110

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

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser  
 130 135 140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala  
 145 150 155 160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp  
 165 170 175

Ser Arg Gly

<210> 61  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 61

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val  
 1 5

<210> 62  
 <211> 308  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 62

Met Gly Phe Arg Leu Leu Cys Cys Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

043746

Gly Pro Val Asp Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr  
 20 25 30

Ala Thr Gly Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Ala Met Asp His  
 35 40 45

Pro Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe  
 50 55 60

Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu  
 65 70 75 80

Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn  
 85 90 95

Leu Ser Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser  
 100 105 110

Ser Val Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu  
 115 120 125

Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
 130 135 140

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
 145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
 165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln  
 180 185 190

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
 195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
 210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
 225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
 245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly  
 260 265 270

Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
 275 280 285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
 290 295 300

Arg Lys Asp Phe  
 305

<210> 63  
 <211> 274  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 63

Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser  
 1 5 10 15

Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu  
 20 25 30

Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp  
 35 40 45

Arg Arg Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser  
 50 55 60

Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly  
 65 70 75 80

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

Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala  
 100 105 110

Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys  
 115 120 125

Leu Ser Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln  
 130 135 140

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp  
 145 150 155 160

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr  
 165 170 175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser  
 180 185 190

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn  
 195 200 205

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro  
 210 215 220

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp  
 225 230 235 240

Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu  
 245 250 255

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp  
 260 265 270

Ser Ser

<210> 64  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 64

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
 1 5 10 15

Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
 20 25 30

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
 35 40 45

Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 50 55 60

Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln  
 65 70 75 80

Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr  
 85 90 95

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 100 105 110



Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro  
 245 250 255

Val Ala Gly Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val  
 260 265 270

Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly  
 275 280 285

Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu  
 290 295 300

Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe  
 305 310 315 320

Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg  
 325 330 335

Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Tyr Ser  
 340 345 350

Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser

043746

355 360 365  
 Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 370 375 380  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 385 390 395 400  
 Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly Gln Arg  
 405 410 415  
 Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Ala Met Asp His Pro Tyr Val Tyr Trp  
 420 425 430  
 Tyr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr  
 435 440 445  
 Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Ser Glu Arg Phe Ser Ala  
 450 455 460  
 Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser  
 485 490 495  
 Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp  
 500 505 510  
 Leu Lys Asn  
 515  
 <210> 65  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 65  
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
 20 25 30  
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
 35 40 45  
 Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

043746

50 55 60

Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln  
65 70 75 80

Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr  
85 90 95

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp  
115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro  
245 250 255

Val Ala Gly Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val  
260 265 270

Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Arg  
275 280 285

Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu  
290 295 300

## 043746

Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe  
305 310 315 320

Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg  
325 330 335

Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Tyr Ser  
340 345 350

Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser  
355 360 365

Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
370 375 380

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
385 390 395 400

Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly Gln Arg  
405 410 415

Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Ala Met Asp His Pro Tyr Val Tyr Trp  
420 425 430

Tyr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr  
435 440 445

Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Ser Glu Arg Phe Ser Ala  
450 455 460

Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu Glu  
465 470 475 480

Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser  
485 490 495

Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp  
500 505 510

Leu Lys Asn  
515

<210> 66  
<211> 515  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 66

043746

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
 1 5 10 15

Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
 20 25 30

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
 35 40 45

Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 50 55 60

Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln  
 65 70 75 80

Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr  
 85 90 95

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro  
 245 250 255

Val Ala Gly Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr  
 260 265 270

Gly Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp Leu Ser  
 275 280 285

Val Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile  
 290 295 300

Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Ser Glu Arg  
 305 310 315 320

Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser  
 325 330 335

Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Val  
 340 345 350

Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val  
 355 360 365

Val Glu Asp Leu Lys Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 385 390 395 400

Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala  
 405 410 415

Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Arg Ser Gln Ser Phe  
 420 425 430

Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser  
 435 440 445

Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu  
 450 455 460

Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro  
 465 470 475 480

Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Tyr Ser Gly Ala Gly Ser  
 485 490 495

Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro Asn  
 500 505 510

Ile Gln Asn  
515

32

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенраспознающая структура, которая является стабильной и способной специфически и/или селективно связываться с антигенным пептидом COL6A3, включающая первый домен и второй домен, каждый включающий три комплементарных детерминантных участка (CDR), где первый домен содержит аминокислотные последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 6 (CDRa2) и 7 (CDRa3) и второй домен содержит аминокислотные последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 14 (CDRb2) и 15 (CDRb3), причем:

а) CDRa1 первого домена изложен в SEQ ID NO: 5 и CDRb1 второго домена выбран из одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 37-44 или

б) CDRa1 первого домена изложен в SEQ ID NO: 26 и CDRb1 второго домена выбран из одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 13 и 37-49;

где антигенраспознающая структура является Т-клеточным рецептором (ТКР), или его производным, или его фрагментом, где производное или фрагмент сохраняет антигенсвязывающую и/или распознающую способность молекулы специфически и/или селективно связываться с антигенным полипептидом COL6A3.

2. Антигенраспознающая структура по п.1, в которой:

(i) первый домен содержит SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 и второй домен содержит SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 40 или

(ii) первый домен содержит SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 и второй домен содержит SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 40.

3. Антигенраспознающая структура по п.2, в которой структура в соответствии с (i) содержит SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 62 или в которой структура в соответствии с (ii) содержит SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63.

4. Антигенраспознающая структура по любому из пп.1-3, где указанная антигенраспознающая структура является стабильной и способна специфически и/или селективно связываться с антигенным пептидом COL6A3, включающим аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, в частности, при участии МНС.

5. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп.1, 2 или 4, где указанный первый домен является частью  $\alpha$ - или  $\gamma$ -цепи ТКР и/или где указанный второй домен является частью  $\beta$ - или  $\delta$ -цепи ТКР.

6. Антигенраспознающая структура по любому из пп.1-5, причем антигенраспознающая структура представляет собой одноцепочечную антигенраспознающую структуру.

7. Антигенраспознающая структура по п.6, причем одноцепочечная антигенраспознающая структура представляет собой одноцепочечный ТКР.

8. Антигенраспознающая структура по любому из пп.1-7, причем антигенраспознающая структура представляет собой растворимый ТКР.

9. Полипептидная цепь, которая является стабильной и способной специфически и/или селективно связываться с антигенным пептидом COL6A3, содержащая первый домен и второй домен, каждый включающий три комплементарных детерминантных участка (CDR), где первый домен содержит аминокислотные последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 6 (CDRa2) и 7 (CDRa3) и второй домен содержит аминокислотные последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 14 (CDRb2) и 15 (CDRb3), причем:

а) CDRa1 первого домена изложен в SEQ ID NO: 5 и CDRb1 второго домена выбран из одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 37-44 или

б) CDRa1 первого домена изложен в SEQ ID NO: 26 и CDRb1 второго домена выбран из одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 13 и 37-49.

10. Нуклеиновая кислота, кодирующая антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп.1-8 или полипептидную цепь по п.9.

11. Вектор нуклеиновой кислоты, содержащий нуклеиновую кислоту по п.10.

12. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп.1-8, полипептидную цепь по п.9, нуклеиновую кислоту по п.10 или вектор по п.11.

13. Клетка-хозяин по п.12, где указанная клетка-хозяин является клеткой млекопитающего.

14. Клетка-хозяин по п.13, где указанная клетка-хозяин представляет собой человеческую клетку.

15. Клетка-хозяин по любому из пп.12-14, где указанная клетка-хозяин представляет собой:
- а) лимфоцит, предпочтительно Т-лимфоцит или клетка-предшественник Т-лимфоцита, более предпочтительно CD4- или CD8-положительная Т-клетка или
  - б) не лимфоцит.
16. Антигенраспознающая структура по любому из пп.1-8, полипептидная цепь по п.9, нуклеиновая кислота по п.10, вектор по п.11 или клетка-хозяин по любому из пп.12-15, где антигенраспознающая структура, полипептидная цепь, нуклеиновая кислота, вектор или клетка-хозяин помечены поддающейся обнаружению меткой.
17. Антигенраспознающая структура, полипептидная цепь, нуклеиновая кислота, вектор или клетка-хозяин по п.16, где поддающаяся обнаружению метка выбрана из группы, состоящей из радиоизотопа, флуорофора, фикоэритрина, фермента и частиц элемента.
18. Фармацевтическая композиция, включающая антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп.1-8, полипептидную цепь по п.9, нуклеиновую кислоту по п.10, вектор по п.11 или клетку-хозяина по п.15а) и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель стабилизатор и/или вспомогательное вещество.
19. Фармацевтическая композиция по п.18, дополнительно содержащая другое фармацевтически активное вещество или лекарственное средство.
20. Фармацевтическая композиция по п.19, где дополнительное фармацевтически активное вещество или лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из аспарагиназы, бусульфана, карбоплатина, цисплатина, даунорубицина, доксорубицина, фтороурацила, гемцитабина, гидроксимочевины, метотрексата, паклитаксела, ритуксимаба, винбластина и винкристина.
21. Способ получения COL6A3-специфической антигенраспознающей структуры в соответствии с любым из пп.1-8, включающий:
- а) обеспечение подходящей клетки-хозяина;
  - б) обеспечение генетической конструкции, включающей кодирующую последовательность, кодирующую антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп.1-8;
  - в) внесение указанной генетической конструкции в указанную подходящую клетку-хозяина;
  - г) экспрессию указанной генетической конструкции указанной подходящей клеткой-хозяином.
22. Способ в соответствии с п.21, дополнительно включающий выделение и очистку антигенраспознающей структуры из подходящей клетки-хозяина и, необязательно, восстановление антигенраспознающей структуры в Т-клетке.
23. Применение антигенраспознающей структуры по любому из пп.1-8 в предупреждении и/или лечении пролиферативного заболевания.
24. Применение полипептидной цепи по п.9 в предупреждении и/или лечении пролиферативного заболевания.
25. Применение нуклеиновой кислоты по п.10 в предупреждении и/или лечении пролиферативного заболевания.
26. Применение вектора по п.11 в предупреждении и/или лечении пролиферативного заболевания.
27. Применение клетки-хозяина по п.15а) в предупреждении и/или лечении пролиферативного заболевания.
28. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.18-20 в предупреждении и/или лечении пролиферативного заболевания.
29. Применение по пп.23-28, где пролиферативное заболевание представляет собой COL6A3-положительное предопухоловое состояние или рак, выбранный из группы, состоящей из рака молочной железы, рака толстой кишки и колоректальной карциномы.
30. Применение по п.29, где указанный рак выбран из рака, в котором имеется избыточная экспрессия или мутации COL6A3 и/или презентуется полученный из COL6A3 опухолеассоциированный антиген.
31. Применение клетки-хозяина по п.15а) для изготовления лекарственного средства для лечения рака или COL6A3-положительного предопухолового состояния у субъекта, нуждающегося в этом, где клетка-хозяин является аутологичной клеткой пациента.
32. Применение клетки-хозяина по п.15а) для изготовления лекарственного средства для лечения рака или COL6A3-положительного предопухолового состояния у субъекта, нуждающегося в этом, где клетка-хозяин является аллогенной клеткой.
33. Способ лечения рака или COL6A3-положительного предопухолового состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:
- а) получение клетки от указанного субъекта;
  - б) трансформирование клетки по меньшей мере одним вектором по п.11 для получения трансформированной клетки;
  - в) культивирование трансформированной клетки для получения множества трансформированных клеток и
  - г) введение множества трансформированных клеток указанному субъекту.



34. Способ выявления рака в биологическом образце, включающий:

а) приведение в контакт биологического образца с антигенраспознающей структурой по любому из пп.1-8;

б) выявление связывания антигенраспознающей структуры с биологическим образцом.

35. Способ обнаружения наличия состояния у млекопитающего, где способ включает стадии:

(i) приведение в контакт образца, содержащего одну или более клеток млекопитающего, с антигенраспознающей структурой по любому из пп.1-8, полипептидной цепью по п.9, нуклеиновой кислотой по п.10, вектором по п.11, клеткой-хозяином по любому из пп.12-15 или фармацевтической композицией по любому из пп.18-20 с образованием комплекса;

(ii) обнаружение комплекса, где обнаружение комплекса указывает на наличие состояния у млекопитающего, где состояние представляет собой рак.

36. Способ по п.35, где образец клеток представляет собой образец, содержащий цельные клетки, их лизаты или фракцию лизата цельных клеток.

37. Способ по п.35 или 36, где антигенраспознающая структура, полипептидная цепь, нуклеиновая кислота, вектор или клетка-хозяин помечены поддающейся обнаружению меткой и этап обнаружения комплекса включает обнаружение поддающейся обнаружению метки.

38. Применение множества трансформированных клеток для изготовления лекарственного средства для лечения рака или COL6A3-положительного предопухолевого состояния у нуждающегося в этом субъекта, где множество трансформированных клеток получают путем:

а) получения клетки от субъекта;

б) трансформации клетки по меньшей мере одним вектором по п.11 для получения трансформированной клетки;

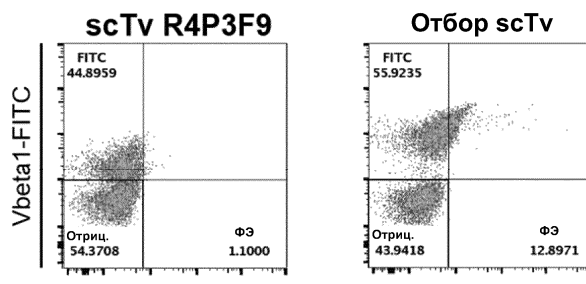
в) культивирования трансформированной клетки для получения множества трансформированных клеток.

39. Применение множества трансформированных клеток для изготовления лекарственного средства для лечения рака или COL6A3-положительного предопухолевого состояния у субъекта, нуждающегося в этом, где множество трансформированных клеток получают путем:

а) получения клетки от здорового донора;

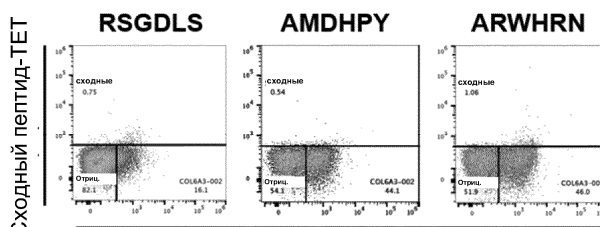
б) трансформирования клетки по меньшей мере одним вектором по п.11 для получения трансформированной клетки;

в) культивирования трансформированной клетки для получения множества трансформированных клеток.



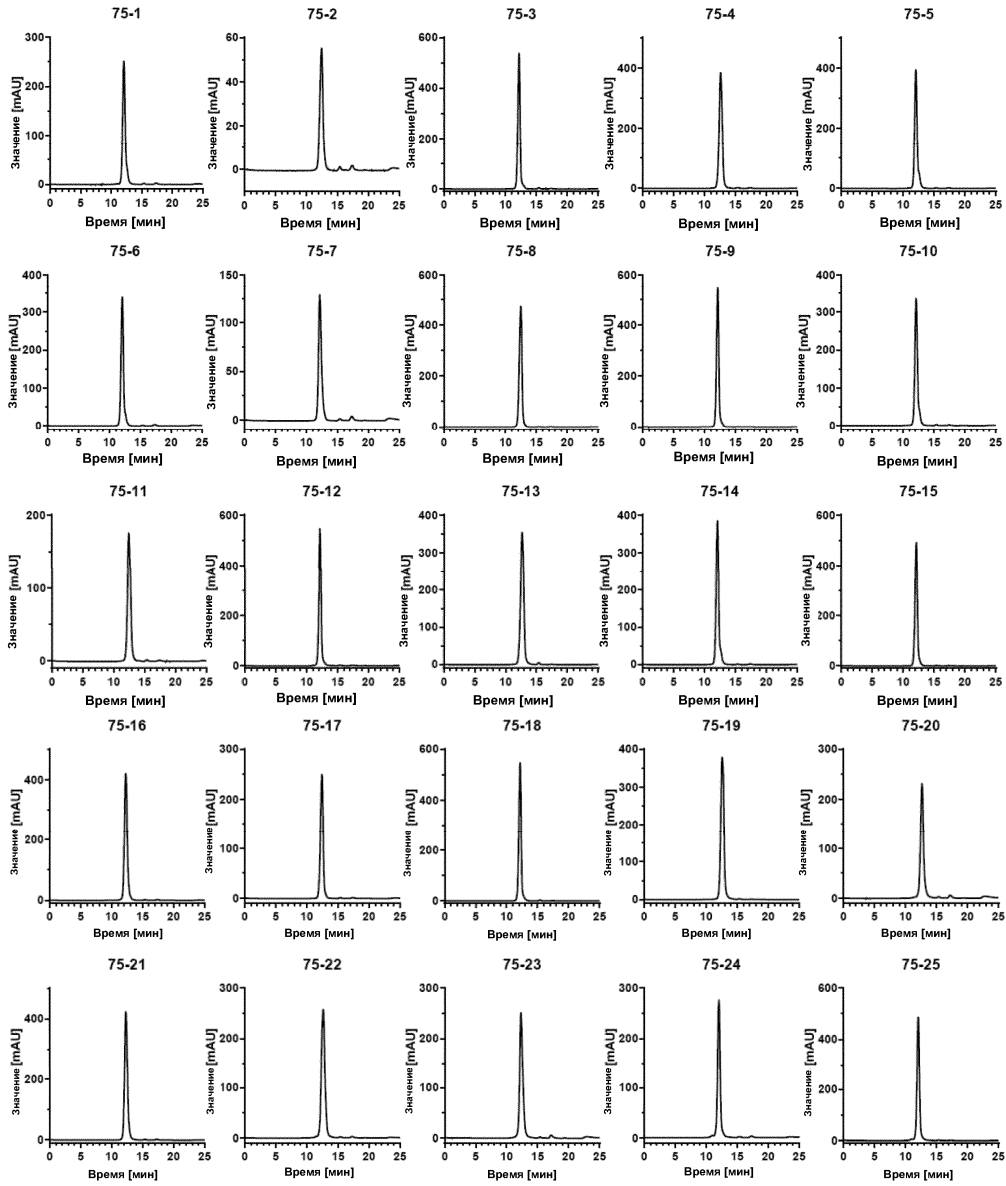
Тетрамер HLA-A\*02/COL6A3-002-ФЭ

Фиг. 1

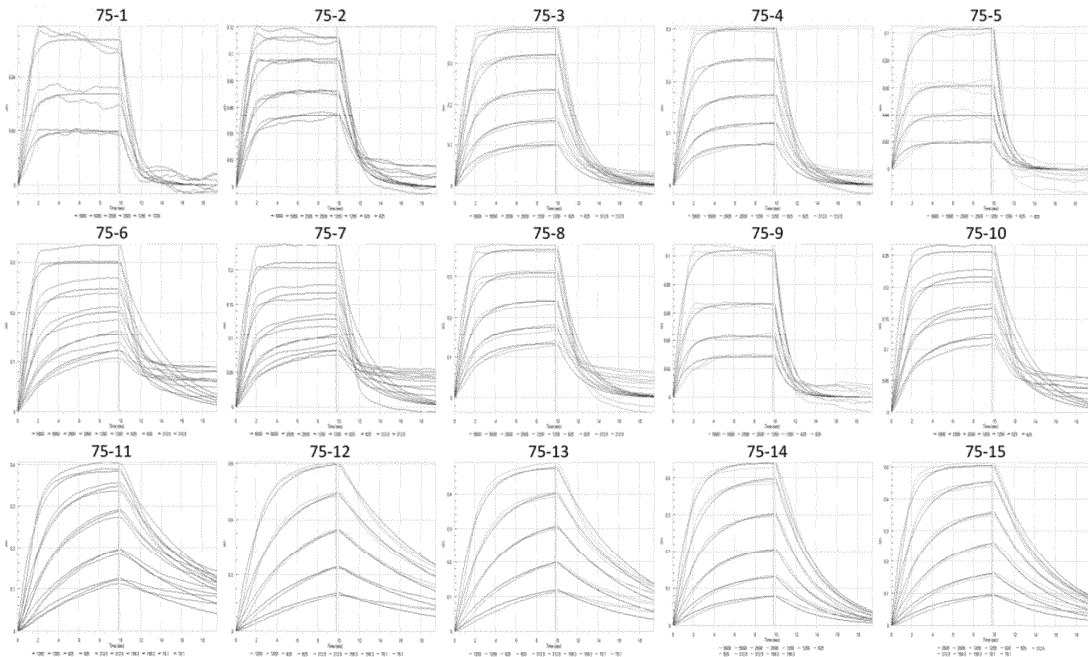


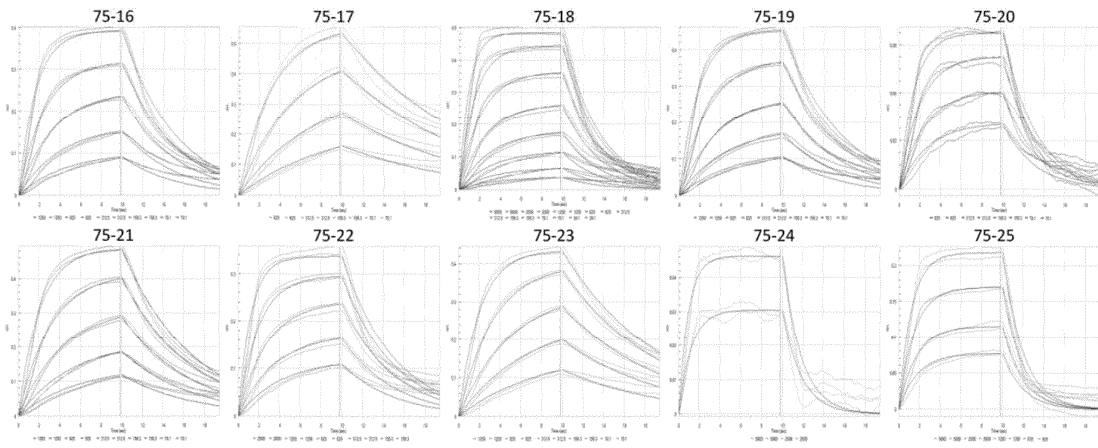
Тетрамер COL6A3-002

Фиг. 2

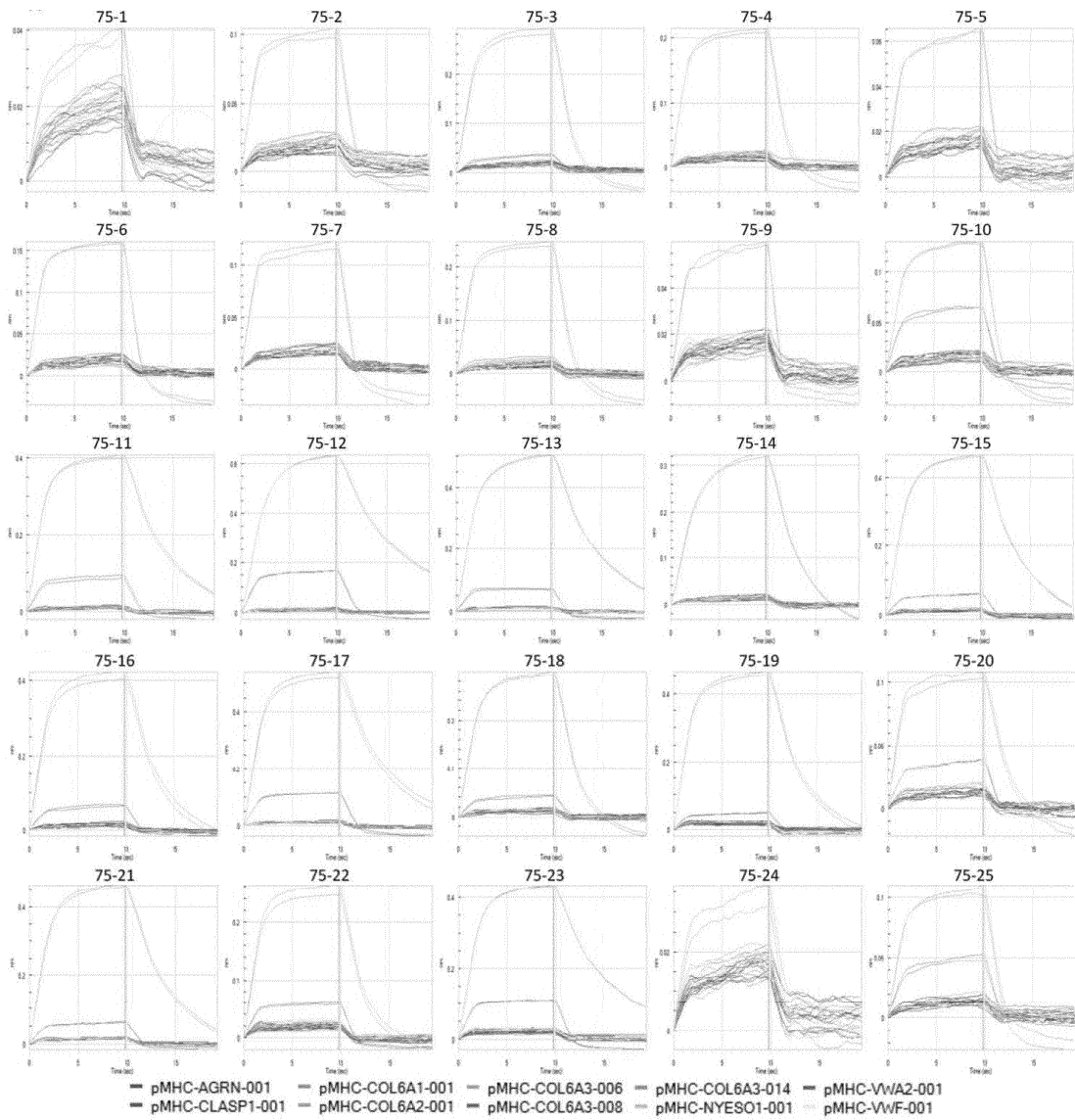


Фиг. 3



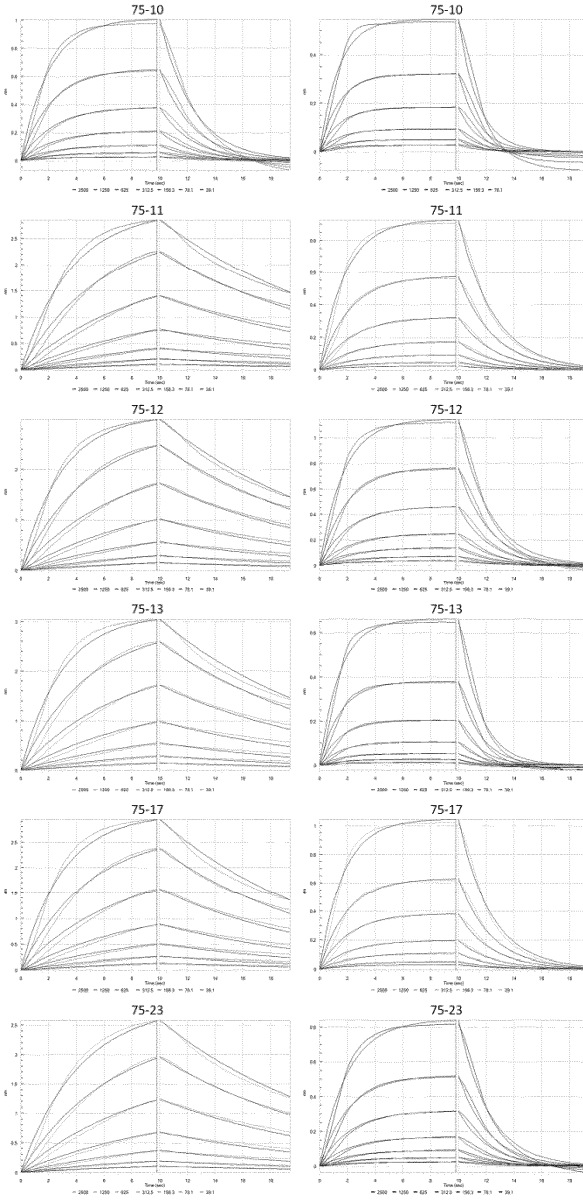


Фиг. 4

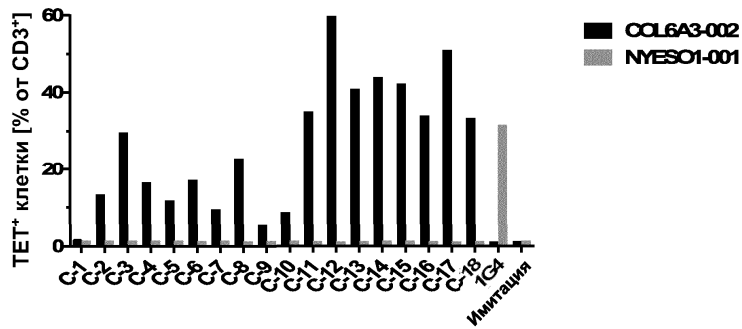


Фиг. 5

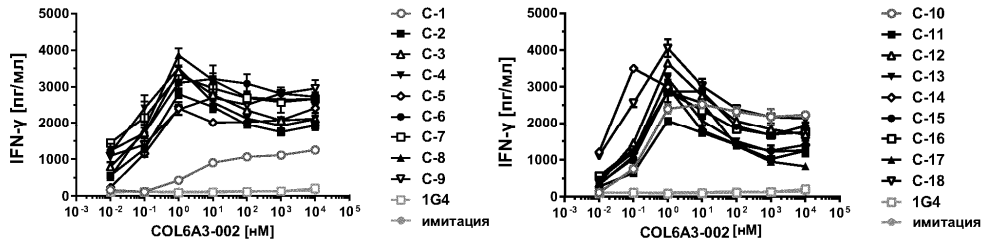
HLA-A\*02/COL6A3-002      HLA-A\*02/COL6A1-001



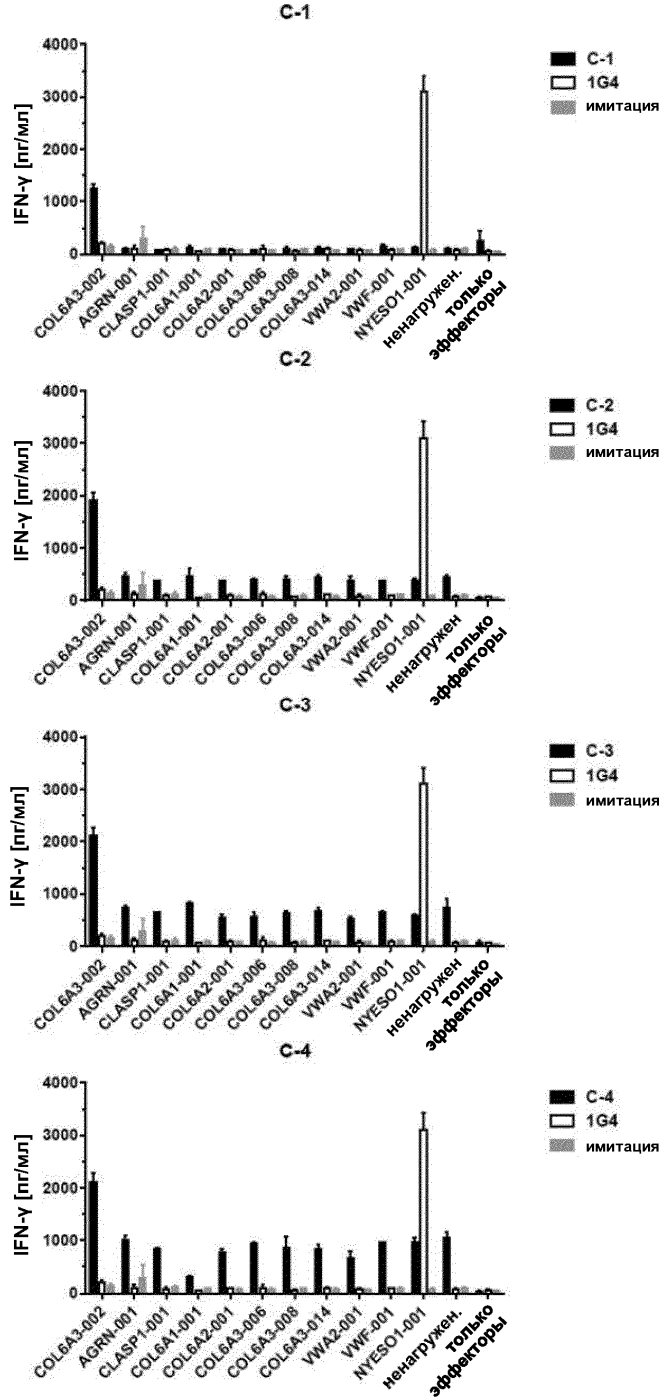
Фиг. 6

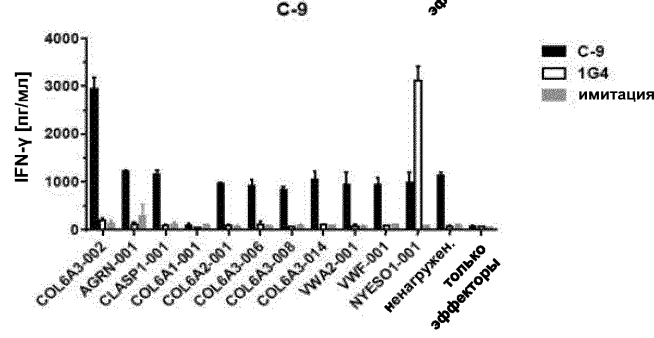
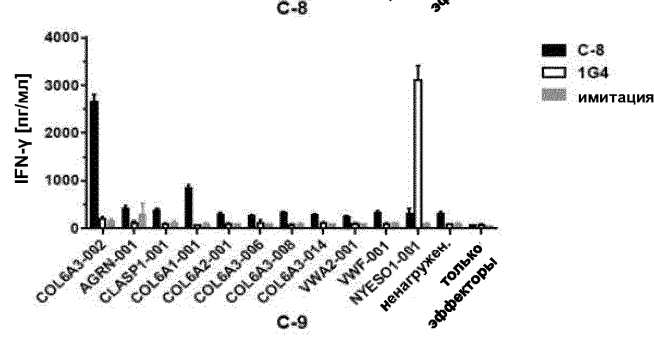
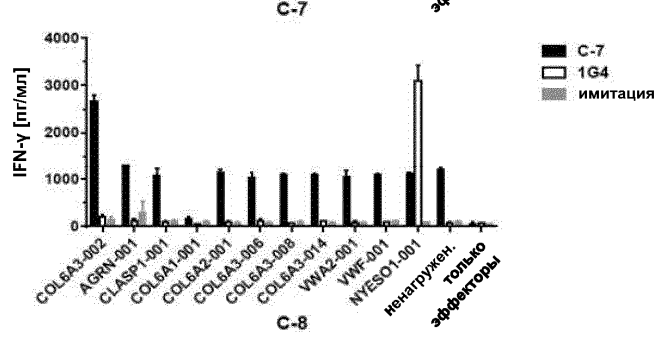
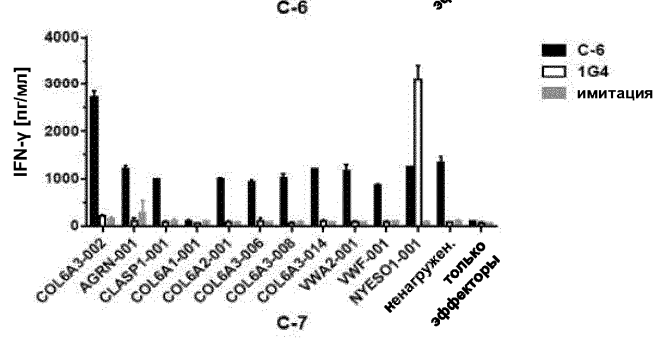
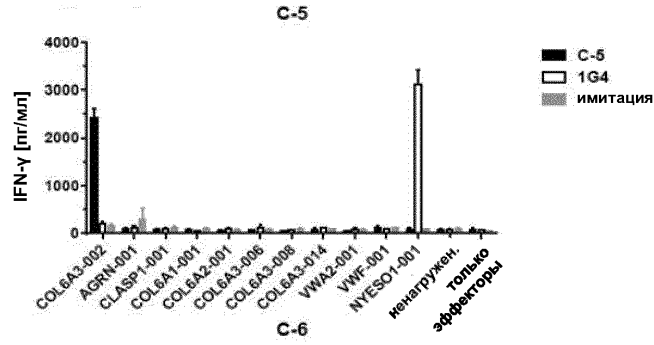


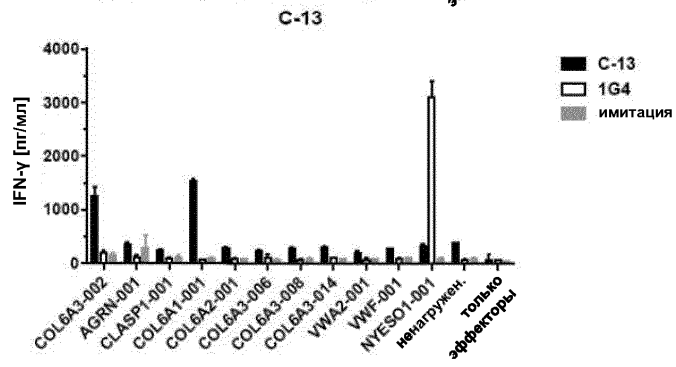
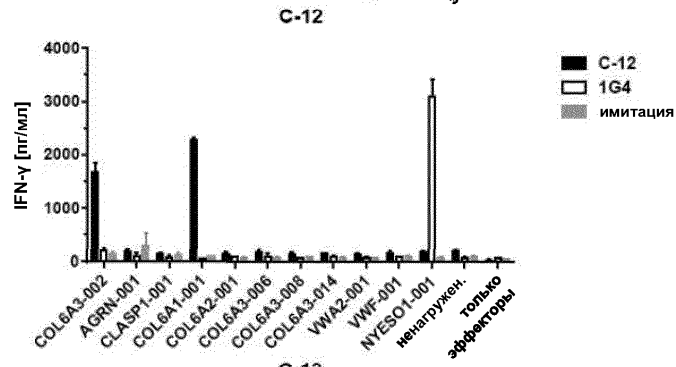
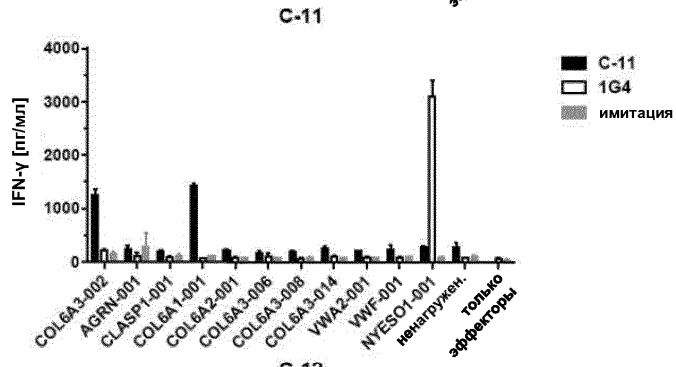
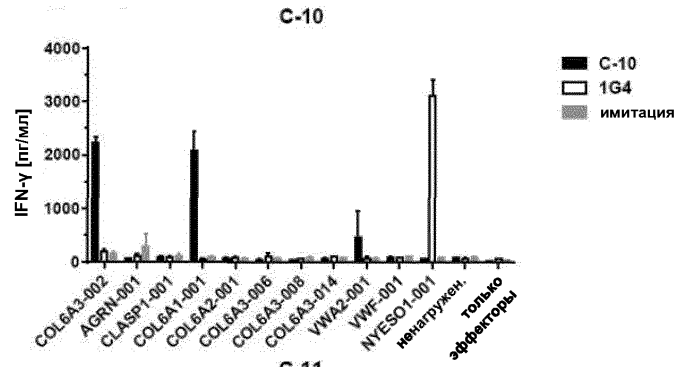
Фиг. 7

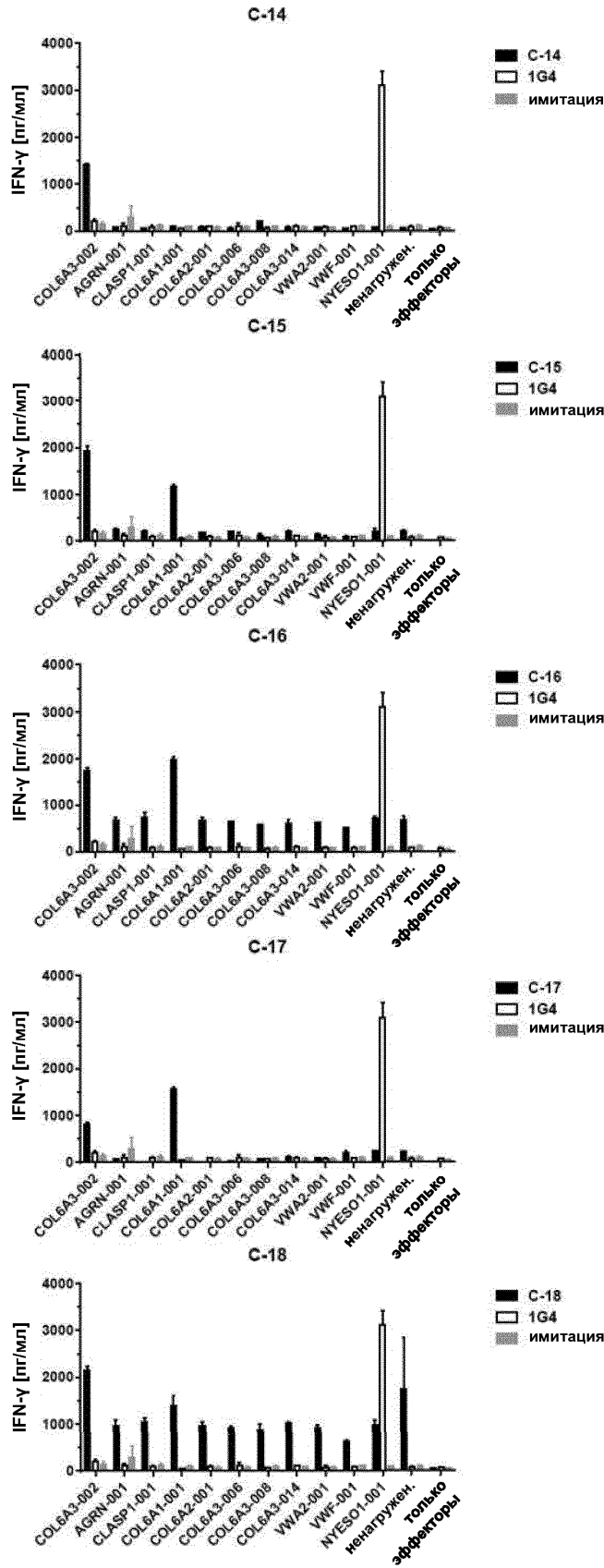


Фиг. 8



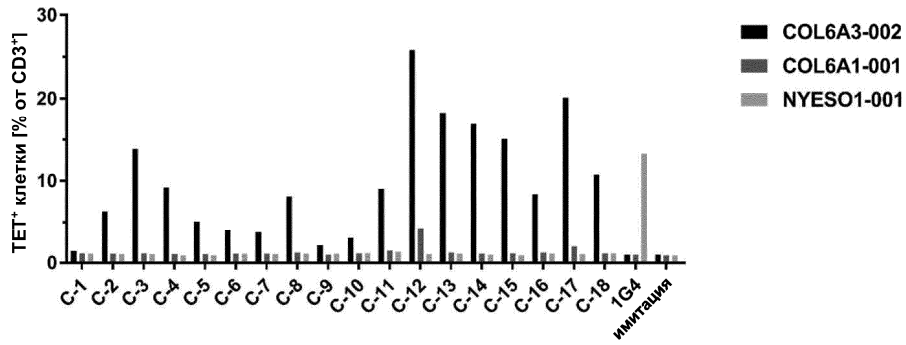




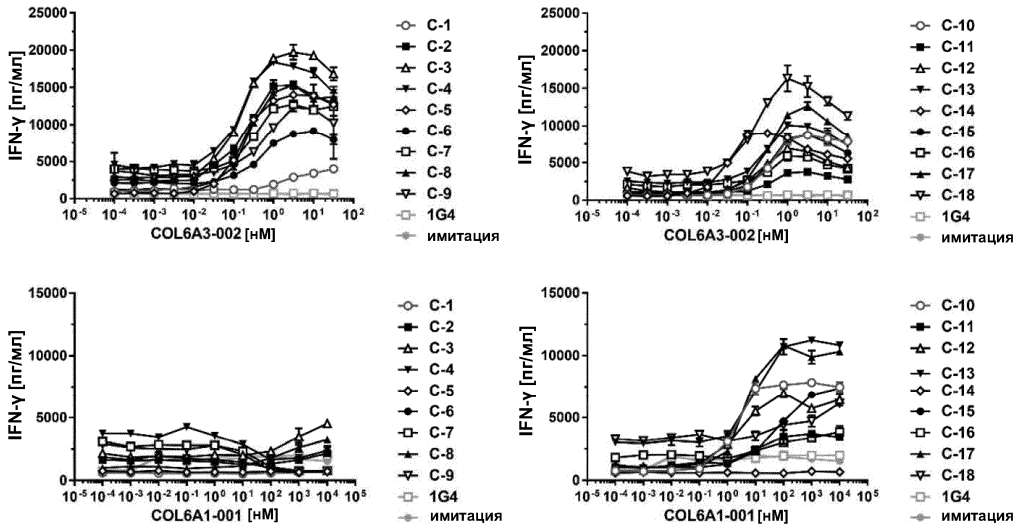


Фиг. 9

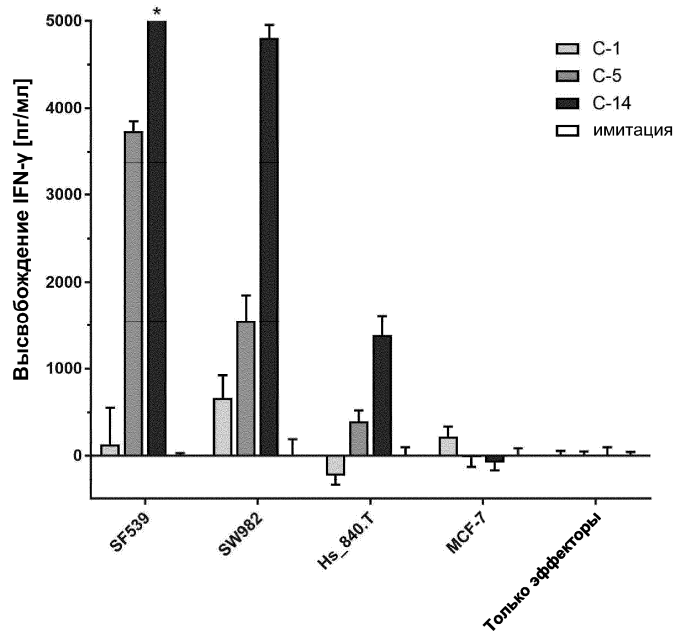




Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

