

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044060**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.07.20**

**(21)** Номер заявки  
**202090149**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.06.27**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/08** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61P 31/20** (2006.01)

---

**(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ПРОТИВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА (HPV) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** 62/525,937

**(32)** 2017.06.28

**(33)** US

**(43)** 2020.05.31

**(86)** PCT/US2018/039654

**(87)** WO 2019/005897 2019.01.03

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Брэй Кевин Э., Дельфино Фрэнк,  
Франклин Мэттью К., Гарнова  
Елена С., Кишнер Джессика Р.,  
Макдоналд Дуглас, Олсон Уилльям,  
Терстон Гэвин (US)**

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

**(56)** WO-A1-2010027973

XU M. ET AL.: "Ii-Key/HPV16 E7 hybrid peptide immunotherapy for HPV16+ cancers", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 27, no. 34, 23 July 2009 (2009-07-23), pages 4641-4647, XP026266831, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2009.05.054 [retrieved on 2009-06-09] abstract, page 4642, column 2, paragraph 4; table 1

EP-A1-2883550

WO-A1-2018067618

WO-A2-02077012

ANGELIKA B. RIEMER ET AL.: "A Conserved E7-derived Cytotoxic T Lymphocyte Epitope Expressed on Human Papillomavirus 16-transformed HLA-A2 + Epithelial Cancers", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 38, 17 September 2010 (2010-09-17), pages 29608-29622, XP055207597, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.126722, table 2

CN-A-105131113

---

**(57)** Изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, которые специфически связываются с HLA-презентированным пептидом вируса папилломы человека (HPV), и к терапевтическим и диагностическим способам применения этих связывающих белков.

---

**B1**

**044060**

**044060  
B1**

### **Связанные применения**

Настоящая заявка претендует на приоритет Предварительной заявки США № 62/525937, поданной 28 июня 2017 год, полное содержание которой прямо включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

### **Список последовательностей**

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен в качестве ссылки. Указанная ASCII-копия, созданная 27 июня 2018 г., называется 10355WO01\_seqlisting.txt и имеет размер 253600 байт.

### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, которые специфически связываются с HLA-презентированным пептидом вируса папилломы человека (HPV), а также к терапевтическим и диагностическим способам применения этих связывающих белков.

### **Уровень техники**

Вирус папилломы человека (HPV) относится к группе небольших безоболочечных ДНК-вирусов, которые чрезвычайно распространены во всем мире. HPV в основном передается половым путем, и большинство людей заражаются HPV вскоре после начала половой жизни.

Существует более 170 типов HPV, часть из которых могут вызывать бородавки или доброкачественные папилломы, а другие, по меньшей мере, 13 из них вызывают злокачественное новообразование (также известные как HPV высокого риска), включая рак шейки матки, аногенитальный рак (рак ануса, пениса, влагалища и вульвы), рак головы/шеи и рак ротоглотки, включая заднюю часть горла, основание языка и миндалины. В самом деле, HPV присутствует в 20-40% всех плоскоклеточных карцином головы и шеи (HNSCC) и в 100% случаев рака шейки матки.

Рак шейки матки является вторым по распространенности злокачественным новообразованием среди женщин, живущих в менее развитых регионах, с оценкой 445000 новых случаев в 2012 г. (84% новых случаев в мире). В 2012 году примерно 270000 женщин умерли от рака шейки матки; более 85% этих смертей происходят в странах с низким и средним уровнем дохода.

Два типа HPV (16 и 18) вызывают примерно 70% всех случаев рака шейки матки и предраковых поражений шейки матки. Развитие рака при персистентной инфекции с HPV подтипа высокого риска, такого как HPV 16 или 18, в основном обусловлено экспрессией двух вирусных онкобелков, E6 и E7, которые постоянно экспрессируются в очагах поражения и присутствуют на клеточной поверхности МНС класса I, но не экспрессируются в нормальных клетках. E6 и E7 способствуют геномной нестабильности и клеточной трансформации путем деградации опухолевых супрессоров p53 и Rb протеасомазависимым образом. Опухоли возникают через несколько лет после первоначальных иммортализационных процессов в клетке, и непрерывная экспрессия E6 и E7 необходима для поддержания трансформированного фенотипа и предотвращения остановки роста клеток и/или апоптоза (McLaughlin-Drubin M.E. & Miinger K., *Virology* (2009) 384: 335-344).

Хотя вакцины против HPV L1 и L2, основных капсидных белков подтипов HPV-6, -11, -16 и -18, были разработаны для предотвращения инфекции, такие вакцины не могут лечить пациентов с выявленными поражениями. Таким образом, лечение пациентов, страдающих раком шейки матки, по-прежнему использует традиционные высокоинвазивные и болезненные подходы, такие как хирургия, лучевая терапия и химиотерапия. Кроме того, хотя такие способы лечения могут быть полезны для пациентов, имеющих раннюю стадию рака шейки матки, они имеют ограниченную ценность для пациентов с запущенным или рецидивирующим раком шейки матки.

Соответственно, в данной области существует неудовлетворенная потребность в новых терапевтических стратегиях для нацеливания на HPV с высокой специфичностью и для лечения рака шейки матки и других видов рака, вызванных HPV.

### **Краткое изложение сущности изобретения**

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, которые специфически связываются с конформационным эпитопом HLA-презентированного пептида E7 вируса папилломы человека (HPV) 16 (HLA-A2:HPV16E7). Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению связываются с высокой степенью специфичности с HLA-презентированными HPV16E7 и не связываются с HLA-презентированными пептидами, которые отличаются на 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот. Антигенсвязывающие белки по изобретению обеспечивают специфическое нацеливание на клетки, презентующие пептид HPV16E7 (т.е. клетки, презентующие на своей поверхности пептид HPV16E7, связанный с молекулой МНС, например, HLA-A2), такие как опухолевые клетки, экспрессирующие HPV16E7, и в некоторых вариантах осуществления стимулирование активации Т-клеток, например, для стимулирования опосредованного Т-клетками уничтожения таких клеток. Кроме того, при слиянии с детектируемым фрагментом антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению позволяют диагностировать и прогнозировать HPV16E7-положительные заболевания или расстройства с высокой чувствительностью к изменениям в количестве и распределении клеток, презентующих пептид HPV16E7, что является более актуальной мерой прогрессирования заболевания, чем уровень HPV16E7 в крови.

Антигенсвязывающие белки по изобретению могут представлять собой антитела, такие как полно-размерные (например, антитела IgG1 или IgG4), или могут содержать только антигенсвязывающую часть

антитела (например, Fab, F (ab')<sub>2</sub> или фрагмент scFv) и могут быть изменены для воздействия на функциональность, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164: 1925-1933). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по изобретению могут представлять собой антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки могут быть биспецифическими.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к выделенным рекомбинантным антигенсвязывающим белкам, которые специфически связываются с конформационным эпитопом HLA-презентированного пептида E7 вируса папилломы человека (HPV) 16, такого как HLA-презентированный пептид, содержащий аминокислотные остатки 11-19 или 82-90 HPV16E7. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки представляют собой антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела являются полностью человеческими.

Типичные антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению перечислены в табл. 1 и 2 в настоящем описании. В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), областей, определяющих комплементарность тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и областей, определяющих комплементарность легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) типичных антител против HLA-A2:HPV16E7. В табл. 2 приведены идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 типичных антител против HLA-A2:HPV16E7.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или по существу сходную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности с ними.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1, или их по существу сходную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности с ними.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, в сочетании с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антигенсвязывающих белков против HLA-A2:HPV16E7, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/290, 298/306, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482, 490/498 506/514 и 522/530. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID NO: 2/10 (например, H4sH17364N), 34/42 (например, H4sH17670P), 82/90 (например, H4sH17675P), 194/202 (например, H4sH17930N2), 282/290 (например, H4sH21064P) и 506/514 (например, H4sH17363N).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам против HLA-A2:HPV16E7, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1, имеющую не более чем пять аминокислотных замен, и указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1, имеющую не более чем пять аминокислотных замен. Например, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам против HLA-A2:HPV16E7, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, имеющую не более чем пять аминокислотных замен, и указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, имеющую не более чем пять аминокислотных замен. В другом типичном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам против HLA-A2:HPV16E7, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, имеющую по меньшей мере одну аминокислотную замену, и указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, имеющую по меньшей мере одну аминокислотную замену.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющей, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1, или их по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1, или их по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, в сочетании с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из типичных антигенсвязывающих белков против HLA-A2:HPV16E7, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16 (например, H4sH17364N), 40/48 (например, H4sH17670P), 88/96 (например, H4sH17675P), 200/208 (например, H4sH17930N2), 288/296 (например, H4sH21064P) и 512/520 (например, H4sH17363N).

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, указанной в табл. 1, на 1 аминокислоту, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, указанной в табл. 1, на 1 аминокислоту, а HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, указанной в табл. 1, на 1 аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная LCVR содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, указанной в табл. 1, на 1 аминокислоту, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся из аминокислотной последовательности, указанной в табл. 1, на 1 аминокислоту, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, указанной в табл. 1, на 1 аминокислоту. Например, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам против HLA-A2:HPV16E7, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная HCVR содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 196 на 1 аминокислоту, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 198 на 1 аминокислоту, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 200 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 200 на 1 аминокислоту. В другом иллюстративном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим HCVR и LCVR, причем указанная LCVR содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 204 на 1 аминокислоту, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ

ID NO: 206 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 206 на 1 аминокислоту, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208 или аминокислотную последовательность, отличающуюся из SEQ ID NO: 208 на 1 аминокислоту.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных антигенсвязывающих белков, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (например, H4sH17364N), 36-38-40-44-46-48 (например, H4sH17670P), 84-86-88-92-94-96 (например, H4sH17675P), 196-198-200-204-206-208 (например, H4sH17930N2), 284-286-288-292-294-296 (например, H4sH21064P) и 508-510-512-516-518-520 (например, H4sH17363N).

В связанном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, содержащим набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено в любом из иллюстративных антигенсвязывающих белков, перечисленных в табл. 1. Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки, содержащие аминокислотные последовательности HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащиеся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (например, H4sH17364N), 34/42 (например, H4sH17670P), 82/90 (например, H4sH17675P), 194/202 (например, H4sH17930N2), 282/290 (например, H4sH21064P) и 506/514 (например, H4sH17363N).

Способы и методы идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области и могут быть использованы для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем описании. Примерные соглашения, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают, например, определение Kabat, определение Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение Kabat основано на изменчивости последовательности, определение Chothia основано на расположении областей структурной петли, а определение AbM является компромиссом между подходами Kabat и Chothia; см., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273: 927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268-9272 (1989). Также доступны общедоступные базы данных для идентификации последовательностей CDR в антигенсвязывающем белке.

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, имеющие модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть полезна модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, или антитело, в котором отсутствует фукозный фрагмент, присутствующий в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277: 26733). В других применениях модификация галактозилирования может быть сделана для модификации комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по изобретению представляют собой моноклональные антитела, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, в сочетании с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела содержат Fc-домен изотипа, выбранного из группы, состоящей из IgA, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM и их варианта.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в табл. 3, или по существу сходную с ними последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90% по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в табл. 3, или по существу сходную с ними последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HC (LC/LC) (HC/LC), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в табл. 3, в сочетании с любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в табл. 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HC/LC, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против PD-1, перечисленных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HC/LC выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 578/579, 580/581, 582/583, 584/585, 586/587, 588/589, 590/591 и 592/593.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с HLA-пептидным комплексом, где антигенсвязывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент контактирует по меньшей мере с 60%, по меньшей мере с 70%, по меньшей мере с 80% или по меньшей мере с 90% аминокислотных остатков пептида, который входит в HLA-пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент "покрывают" или контактируют со всеми аминокислотными остатками пептида, входящего в HLA-пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с HLA-пептидным комплексом с высокой аффинностью и специфичностью, где антигенсвязывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент контактирует по всей длине презентированного пептида. Используемый в настоящем описании термин "контакт" включает прямые или опосредованные водой водородные связи, взаимодействия заряд-заряд или гидрофобные взаимодействия/взаимодействия Ван-дер-Ваальса. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с пептидным комплексом HLA-A2-HPV16E7 11-19, где антигенсвязывающий белок связывается по меньшей мере с 6 из 10 аминокислотных остатков пептида 11-19 (SEQ ID NO: 538) и HLA-A2 таким образом, что он полностью перекрывает HLA-A2-пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR HCVR и CDR LCVR, где каждая HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок является полностью человеческим. В некоторых вариантах осуществления полностью человеческие антигенсвязывающие белки получают с использованием способов и технологий, отличных от фагового дисплея. В одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки содержат вариабельную область легкой цепи подтипа IGKV1-39.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с пептидным комплексом HLA-A2:HPV16E7 11-19, где антигенсвязывающий белок связывается с одной или более аминокислотами SEQ ID NO: 538. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок связывается по меньшей мере с 6 аминокислотами SEQ ID NO: 538. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок связывается с одной или более аминокислотами, выбранными из группы, состоящей из Y11, D14, L15, P17 и E18 SEQ ID NO: 538.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, который специфически связывается с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида E7 вируса папилломы человека (HPV) 16, (пептид HPV16E7), где конформационный эпитоп содержит одну или более аминокислот SEQ ID NO: 538. В некоторых вариантах осуществления конформационный эпитоп содержит одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Y11, D14, L15, P 17 и E18 SEQ ID NO: 538.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, которые конкурируют за специфическое связывание с HLA-A2:HPV16E7 с антигенсвязывающим белком, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, где каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, которые перекрестно конкурируют за связывание с HLA-A2:HPV16E7 с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, где каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонный антигенсвязывающий белок, содержащий CDR HCVR и CDR LCVR, где каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонный антигенсвязывающий белок, содержащий CDR HCVR и CDR LCVR, где HCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 34, 82, 194, 282 и 504, и LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 42, 90, 202, 290 и 514.

В одном варианте осуществления изобретение относится к рекомбинантному выделенному антигенсвязывающему белку, который специфически связывается с конформационным эпитопом HEA-A2-презентированного пептида E7 вируса папилломы человека (HPV) 16 (пептид HPV16E7), где антигенсвязывающий белок обладает свойством, выбранным из группы, состоящей из следующих: (a) связывается с мономерным пептидом HLA-A2:HPV16E7 11-19 с константой равновесия диссоциации связывания (KD) менее чем примерно 20 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (b) связывается с мономерным пептидом HLA-A2:HPV16E7 82-90 с константой равновесия диссоциации связывания (KD) менее чем примерно 25 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (c) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:HPV16E7 11-19, с EC<sub>50</sub>



шествления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты L<sub>CDR3</sub>, перечисленных в табл. 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности с ними.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (т.е. H<sub>CDR1</sub>-H<sub>CDR2</sub>-H<sub>CDR3</sub>), где набор аминокислотных последовательностей H<sub>CDR1</sub>-H<sub>CDR2</sub>-H<sub>CDR3</sub> является таким, как определено любым из иллюстративных антигенсвязывающих белков против HLA-A2:HPV16E7, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (т.е. L<sub>CDR1</sub>-L<sub>CDR2</sub>-L<sub>CDR3</sub>), где набор аминокислотных последовательностей L<sub>CDR1</sub>-L<sub>CDR2</sub>-L<sub>CDR3</sub> является таким, как определено любым из иллюстративных антигенсвязывающих белков против HLA-A2:HPV16E7, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности с ними, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97% по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ними. В некоторых вариантах осуществления согласно этому аспекту изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где обе HCVR и LCVR получены из одного и того же антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7, указанного в табл. 1.

Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи, перечисленных в табл. 3. Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей легкой цепи, перечисленных в табл. 3.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как тяжелую цепь (HC), так и легкую цепь (LC), где HC содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в табл. 3, и где LC содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в табл. 3.

В связанном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантным экспрессирующим векторам, способным к экспрессии полипептида, содержащего переменную область тяжелой и/или легкой цепи антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, т.е. молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как указано в табл. 1. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным экспрессирующим векторам, способным экспрессировать полипептид, содержащий тяжелую и/или легкую цепь антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, т.е. молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей тяжелой цепи или легкой цепи, как указано в табл. 2. В объем настоящего изобретения также включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антигенсвязывающих белков путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антигенсвязывающие белки, и извлечение антигенсвязывающих белков, полученных таким образом.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество выделенного рекомбинантного антигенсвязывающего белка, который специфически связывается с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7 (например, пептида, содержащего аминокислотные остатки 11-19 или 82-90 HPV16E7) и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 и второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который преимущественно комбинируется с антигенсвязывающим белком против HLA-A2:HPV16E7. Типичные агенты, которые можно преимущественно комбинировать с антигенсвязывающим белком против HLA-A2:HPV16E7, включают, без ограничения, другие агенты, которые связывают и/или модулируют репликацию или инфекцию HPV (включая другие антигена или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.) и/или агенты, которые модулируют активацию иммунных клеток. Дополнительно



ные способы лечения, которые можно использовать в комбинации с антигенсвязывающими белками против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению, раскрыты в другом месте настоящего описания.

В четвертом аспекте изобретение относится к способам лечения пациента, имеющего ассоциированное с HPV заболевание или расстройство, такое как HPV16E7-положительное злокачественное новообразование. Способы включают введение терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению пациенту, нуждающемуся в этом. Расстройство, которое подвергают лечению, представляет собой любое заболевание или состояние, которое улучшается, нейтрализуется, ингибируется или предотвращается антигенсвязывающими белками и композициями, представленными в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок (или фармацевтическую композицию) по изобретению вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом пациенту, нуждающемуся в этом. Второй терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из антитела к Т-клеточному коингибитору, антитела к антигену опухолевых клеток, антитела к Т-клеточному рецептору, антитела к эпитопу на клетке, инфицированной вирусом, цитотоксического агента, противоопухолевого лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства (например, кортикостероиды), химиотерапевтического средства, хирургического вмешательства, лучевой терапии, иммунодепрессанта и любого другого лекарственного средства или терапии, известной в данной области. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент может представлять собой агент, который помогает нейтрализовать или уменьшить любой возможный побочный эффект (эффекты), связанный с антигенсвязывающим белком по изобретению, если такой побочный эффект (эффекты) должен иметь место.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам подавления роста HPV-ассоциированного злокачественного новообразования. Например, настоящее изобретение относится к способам подавления опухолевого роста первичной опухоли или метастатической опухоли у пациента. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам повышения выживаемости (например, выживаемости без прогрессирования или общей выживаемости) у пациента с HPV-ассоциированным злокачественным новообразованием. Примеры злокачественного новообразования включают, но не ограничиваются этим, плоскоклеточный рак, такой как плоскоклеточный рак головы и шеи, рак шейки матки, аногенитальный рак, рак ротоглотки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам ингибирования или подавления роста выявленных опухолей. Способы включают введение пациенту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

Антигенсвязывающий белок, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, можно вводить подкожно, внутривенно, внутриклеточно, внутримышечно, перорально, внутримышечно или внутривенно.

Антигенсвязывающий белок, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, можно вводить в дозе от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела пациента.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR). CAR может включать внеклеточный связывающий домен, который специфически связывается с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида E7 вируса папилломы человека (HPV) 16 (пептид HPV16E7), например, аминокислотные остатки 11-19 или 82-90 HPV16E7, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В одном варианте осуществления внеклеточный связывающий домен представляет собой антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7 или его антигенсвязывающий фрагмент. Типичные антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению представляют собой любой из антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем документе.

Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, подходящий для использования в CAR по изобретению, содержит три области, определяющие комплементарность тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой одной из последовательностей вариационной области тяжелой цепи (HCVR), перечисленных в табл. 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариационной области легкой цепи (LCVR), перечисленных в табл. 1.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, подходящий для использования в CAR по изобретению, включает HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; и/или LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, подходящий для использования в CAR по изобретению, включает (a) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; и (b) LCVR,

имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок, подходящий для использования в CAR по изобретению, содержит (а) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 460, 476, 492, 508 и 524; (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 462, 478, 494, 510 и 526; (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 464, 480, 496, 512 и 528; (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 222, 244 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 468, 484, 500, 516 и 532; (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158 174, 190, 206, 230, 246, 262 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 470, 486, 502 518 и 534; и (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 472, 488, 504, 520 и 536.

В дополнительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок, подходящий для использования в CAR по изобретению, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/290, 298/306, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482, 490/498, 506/514 и 522/530, как, например, пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 34/42, 82/90, 194/202, 282/290 и 506/514.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный антигенсвязывающий белок для использования в CAR по настоящему изобретению представляет собой scFv.

В других аспектах настоящее изобретение относится к векторам, содержащим выделенные молекулы нуклеиновой кислоты CAR; и иммунные эффекторный клетки, содержащие такие векторы.

В других аспектах настоящего изобретения предложены способы лечения пациента, имеющего HPV-ассоциированное заболевание или расстройство, такое как HPV16E7-положительное злокачественное новообразование, например плоскоклеточный рак, например рак шейки матки, мелкоклеточный рак головы и шеи, аногенитальный рак и рак ротоглотки. Способы включают введение пациенту популяции иммунных эффекторных клеток, содержащих CAR по изобретению.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам детектирования HPV16E7-положительных клеток, например, у пациента или в образце, полученном от пациента. Способы включают в себя контакт с клеткой, такой как образец клетки, полученный от пациента, или введение пациенту антигенсвязывающего белка по изобретению, содержащего детектируемый фрагмент, и детектирование присутствия детектируемого фрагмента.

Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

### Подробное описание

Перед тем как будут описаны способы по настоящему изобретению, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что использованная в настоящем описании терминология необходима только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения рамок настоящего изобретения, которые будут ограничены только прилагаемой формулой изобретения.

Если иное не определено, все технические и научные термины, использованные в настоящем описании, имеют те же значения, которые вкладываются в них обычным специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя любые методы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, также могут использоваться на практике или при тестировании настоящего изобретения, далее будут описаны предпочтительные методы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки в полном объеме.

Термин "вирус папилломы человека" ("HPV") относится к небольшому безоболочечному вирусу дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), который поражает клетки кожи или слизистой оболочки. Замкнутый двухцепочечный вирусный геном имеет длину приблизительно 8 т.п.о. Геном кодирует 6 ранних белков, ответственных за репликацию вируса, и 2 поздних белка, L1 и L2, которые являются вирусными структурными белками. Есть более 170 типов HPV, которые были идентифицированы, и они обозначены номерами. Некоторые типы HPV, такие как HPV-5, могут вызывать инфекции, которые сохранились в течение всей жизни человека без каких-либо клинических симптомов. HPV типов 1 и 2 могут вызывать

обычные бородавки у некоторых инфицированных людей. HPV типов 6 и 11 могут вызывать генитальные бородавки и респираторный папилломатоз. Типы HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 и 82 считаются канцерогенными.

Термин "HPV16E7" относится к раннему гену HPV типа 16, обозначенному E7, и белку, транслируемому с гена.

Аминокислотная последовательность полноразмерного HPV16E7 представлена в GenBank под номером доступа NP\_041326.1 (SEQ ID NO: 537). Термин "HPV16E7" включает рекомбинантный HPV16E7 или его фрагмент. Термин также охватывает HPV16E7 или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью, такой как ROR1. В некоторых вариантах осуществления термин включает HPV16E7 или его фрагмент в контексте HLA-A2, связанный с HLA-A2 или презентируемый HLA-A2.

Термин "HLA" относится к системе или комплексу лейкоцитарного антигена человека (HLA), который представляет собой генный комплекс, кодирующий белки основного комплекса гистосовместимости (МНС) у человека. Эти белки клеточной поверхности отвечают за регуляцию иммунной системы у человека. HLA, соответствующие МНС класса I (A, B и C), презентируют пептиды внутри клетки.

Термин "HLA-A" относится к группе человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA), которые кодируются локусом HLA-A. HLA-A является одним из трех основных типов рецепторов клеточной поверхности МНС класса I человека. Рецептор представляет собой гетеродимер и состоит из тяжелой  $\alpha$ -цепи и меньшей  $\beta$ -цепи.  $\alpha$ -цепь кодируется вариантом гена HLA-A, а  $\beta$ -цепь ( $\beta$ 2-микроглобулин) представляет собой инвариантную молекулу  $\beta$ 2-микроглобулина.

Термин "HLA-A2" относится к одной конкретной группе аллелей главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС) в локусе HLA-A;  $\alpha$ -цепь кодируется геном HLA-A\*02, а  $\beta$ -цепь кодируется локусом  $\beta$ 2-микроглобулина или B2M.

Используемый в настоящем описании термин "антигенсвязывающий белок", "связывающий белок" или "связывающая молекула" включает молекулы, которые содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с интересующей молекулой, такой как конформационный эпитоп HLA-A2-презентированного пептида E7 вируса папилломы человека (HPV) 16 (пептид HPV16E7), например, HLA-A2-презентированного пептида, содержащего аминокислотные остатки 11-19 или 82-90. Связывающий белок может представлять собой антитело, такое как полноразмерное антитело, или антигенсвязывающий фрагмент антитела, или химерный антигенный рецептор (CAR), или любой другой полипептид, например белок рецептор-антитело (Rab).

Термин "антигенсвязывающий белок HLA-A2:HPV16E7" или "антигенсвязывающий белок HLA-A2:HPV16E7" или тому подобное относится к антигенсвязывающему белку, такому как антитело, или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с конформационным эпитопом путем презентирования пептидного фрагмента HPV16E7, например, аминокислотных остатков 11-19 или аминокислотных остатков 82-90 с помощью HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления конформационный эпитоп создается на поверхности клетки HLA-A2-презентированным пептидом HPV16E7.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в варибельной области антигенсвязывающего белка, известным как паратоп. Один антиген может иметь более чем один эпитоп. Таким образом, разные антигенсвязывающие белки могут связываться с различными участками антигена и могут иметь разные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к сайту на антигене, на который отвечают В и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, которая связана антигенсвязывающим белком. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, являются подгруппой структурных эпитопов и имеют те остатки, которые непосредственно способствуют аффинности взаимодействия. Эпитопы также могут быть "конформационными", т.е. состоять из нелинейных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахара, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, в некоторых вариантах осуществления, могут иметь конкретные трехмерные структурные характеристики и/или характеристики удельного заряда.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Используемый в настоящем описании термин "антитело" предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями (т.е. "полные молекулы антител"), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи ("HCVR" или "V<sub>H</sub>") и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>). Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи ("LCVR" или "V<sub>L</sub>") и константной области легкой цепи (CL). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть далее подраз-

делены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В некоторых вариантах осуществления изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть природно или искусственно модифицированы. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

Замена одного или более остатков CDR или пропуск одной или более CDR также возможны. В научной литературе были описаны антигенсвязывающие белки, такие как антитела, в которых можно обойтись без одного или двух CDR для связывания. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9: 133-139) проанализировали области контакта между антителами и их антигенами, основываясь на опубликованных кристаллических структурах, и пришли к выводу, что только от одной пятой до одной трети остатков CDR действительно связываются с антигеном. Padlan также обнаружил много антител, в которых одна или две CDR не имели аминокислот, контактирующих с антигеном (см. Также Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320: 415-428).

Остатки CDR, не связывающиеся с антигеном, могут быть идентифицированы на основе предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются) из областей CDR Kabat, лежащих вне CDR Chothia, путем молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или его остаток(остатки) пропущен, его обычно заменяют аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности антитела человека, или консенсусом таких последовательностей. Положения для замены в CDR и аминокислоты для замены также могут быть выбраны эмпирически. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

Антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, например полностью человеческие моноклональные антитела против HLA-A2:HPV16E7 или их антигенсвязывающие фрагменты, или CAR, раскрытые в настоящем описании, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко выявить путем сравнения раскрытых в настоящем описании аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, или CAR, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем описании, где одна или более аминокислот в одной или более каркасной и/или CDR-области подвергают мутации в соответствующий остаток(остатки) последовательности зародышевой линии, из которой был получен антигенсвязывающий белок, или в соответствующий остаток(остатки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в остаток с помощью консервативной аминокислотной замены соответствующего остатка(остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в настоящем описании совместно как "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области, начиная с описанных в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получать многочисленные антигенсвязывающие белки, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, или CAR, которые содержат одну или более индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все остатки каркаса и/или CDR в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  подвергают мутации обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой был получен антигенсвязывающий белок, например антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергают мутации обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков каркаса и/или CDR подвергают мутации в соответствующий остаток(остатки) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой исходно было получено антитело). Кроме того, антигенсвязывающие белки, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или CAR, по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных и/или CDR-областях, например, в которых некоторые индивидуальные остатки подвергают мутации в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или подвергаются мутации в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антигенсвязывающие белки, например антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко проверить на одно или более желательных свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, усиленные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), пониженная иммуногенность и т.д. Антигенсвязывающие белки, например антитела или их антигенсвязывающие

звывающие фрагменты, или CAR, полученные этим общим способом, включены в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие белки, например полностью человеческие моноклональные антитела против HLA-A2:HPV16E7 или их антигенсвязывающие фрагменты, или CAR, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем описании, имеющих одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее, и т.д. консервативных аминокислотных замен относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем описании.

Подразумевается, что используемый в настоящем описании термин "человеческое антитело" включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие моноклональные антитела (mAb) по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако используемый в настоящем описании термин "человеческое антитело", не предназначен для включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были трансплантированы на последовательности FR человека. Термин включает антитела, рекомбинантно продуцируемые у млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Термин не предназначен для включения антител, выделенных или генерированных у человека.

Используемый в настоящем описании термин "рекомбинантный" относится к антигенсвязывающим белкам, например антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, по изобретению, созданным, экспрессированным, выделенным или полученным с помощью технологий или способов, известных в данной области техники, как, например, технология рекомбинантных ДНК, которая включает, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к антигенсвязывающим белкам, например антителам, экспрессируемым у млекопитающего, не являющегося человеком (включая трансгенных млекопитающих, не являющихся человеком, например, у трансгенных мышей), или в системе экспрессии в клетке (например, клетках CHO), или к выделенным из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека.

Используемые в настоящем описании термины "химерный антигенный рецептор" или "CAR", используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, относятся к рекомбинантному слитому белку, содержащему внеклеточный домен, способный связываться с антигеном (например, конформационный эпитоп HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7 например, пептида, содержащего аминокислотные остатки 11-19 или 82-90 HPV16E7), трансмембранный домен и, по меньшей мере, один внутриклеточный сигнальный домен.

Используемый в настоящем описании термин "иммунная эффекторная клетка" относится к любой клетке иммунной системы, которая имеет одну или более эффекторных функций (например, активность по уничтожению цитотоксических клеток, секреция цитокинов, индукция ADCC и/или CDC). В одном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки, используемые с CAR, как описано в настоящем документе, представляют собой Т-лимфоциты, в частности цитотоксические Т-клетки (CTL; CD8+ Т-клетки) и хелперные Т-клетки (HTL; CD4+ Т-клетки). Другие популяции Т-клеток также применимы в данном случае, например, нативные Т-клетки и Т-клетки памяти. Как будет понятно специалисту в данной области, другие клетки также могут быть использованы в качестве иммунных эффекторных клеток с CAR, как описано в настоящем документе. В частности, иммунные эффекторные клетки также включают НК-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы и макрофаги. Иммунные эффекторные клетки также включают предшественники эффекторных клеток, где такие клетки-предшественники можно индуцировать для дифференцировки в иммунные эффекторные клетки *in vivo* или *in vitro*. Таким образом, в этом отношении иммунная эффекторная клетка включает предшественники клеток-эффекторов, такие как гемопоэтические стволовые клетки (HSC), содержащиеся в популяции CD34+ клеток, полученных из пуповинной крови, костного мозга или мобилизованной периферической крови, которые при введении пациенту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки или которые можно индуцировать *in vitro* для дифференцировки в зрелые иммунные эффекторные клетки.

Как раскрыто в настоящем описании, термин "нецелевой пептид" относится к пептиду, который отличается на 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот от целевого пептида (например, пептида HPV16 E7 11-19). В некоторых вариантах осуществления термин включает пептид, который отличается на 3 или менее аминокислот по сравнению с целевым пептидом. Например, для 9-мерного пептида, если 1, 2 или 3 аминокислоты не идентичны целевому пептиду, он считается "нецелевым" пептидом. В некоторых вариантах осуществления идентичность аминокислот выражается в терминах "степени сходства" (DoS). Если 6 или более аминокислот в 9-мерном пептиде идентичны, DoS составляет 6. В некоторых вариантах осуществления пептид с  $DoS \leq 6$  считается "нецелевым" пептидом. Термин "нецелевой" пептид также отно-

сится к пептиду, который подобен целевому пептиду на основании гомологии последовательности, по прогнозам связывается с HLA-A2 и содержится в белке, который экспрессируется в основных нормальных тканях.

Термин "специфически связывается" или "специфически связывается с" или тому подобное означает, что антигенсвязывающий белок, например антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, или CAR, образует комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться константой равновесной диссоциации, равной, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^{-8}$  М или менее (например, меньшая  $K_D$  обозначает более плотное связывание). Способы определения того, являются ли две молекулы специфически связывающимися, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Как описано в настоящем документе, антигенсвязывающие белки, например антитела, были идентифицированы с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, которые специфически связываются с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида E7 вируса папилломы человека (HPV) 16 (пептида HPV16E7), например, пептида, содержащего аминокислотные остатки 11-19 или 82-90 HPV16E7.

Термин "высокоаффинный" антигенсвязывающий белок, например антитело, относится к тем антигенсвязывающим белкам, например, mAb, которые имеют аффинность связывания с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7, например, пептида, содержащего аминокислотные остатки 11-19 или 82-90 HPV16E7, выраженную в виде  $K_D$ , по меньшей мере,  $10^{-8}$  М; предпочтительно  $10^{-9}$  М; более предпочтительно  $10^{-10}$  М, еще более предпочтительно  $10^{-11}$  М, еще более предпочтительно  $10^{-12}$  М, как измерено поверхностным плазмонным резонансом, например, BIACORE™ или ИФА раствор-аффинность.

Под термином "скорость замедления" "Koff" или "kd" подразумевается антигенсвязывающий белок, который диссоциирует из HLA-A2:HPV16E7, с константой скорости  $1 \times 10^{-3}$  с<sup>-1</sup> или менее, предпочтительно  $1 \times 10^{-4}$  с<sup>-1</sup> или менее, как определено поверхностным плазмонным резонансом, например, BIACORE™.

Термины "антигенсвязывающая часть" антигенсвязывающего белка (например, антитела), "антигенсвязывающий фрагмент" антигенсвязывающего белка (например, антитела) и тому подобное, используемые в настоящем описании, включают любые встречающиеся в природе, ферментативно получаемые, синтетические или генно-инженерные полипептид или гликопротеин, которые специфически связываются с антигеном с образованием комплекса. Термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" в контексте настоящего описания относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7, например пептида, содержащего аминокислотные остатки 11-19 или 82-90 HPV16E7, связанные с HLA-A2.

В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, например антитело или фрагменты антител или CAR, по изобретению могут быть конъюгированы с фрагментом, таким как лиганд, детектируемый фрагмент или терапевтический фрагмент ("иммуноконъюгат"), такой как цитотоксин, второй антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7, антитело к опухолеспецифическому антигену, противоопухолевое лекарственное средство или любой другой терапевтический компонент, полезный для лечения заболевания или состояния, включая HPV-ассоциированное заболевание или расстройство, такое как HPV16E7-положительное злокачественное новообразование или инфекция HPV, включая хроническую инфекцию HPV.

Термин "выделенный антигенсвязывающий белок", например, выделенное антитело, используемое в настоящем документе, предназначен для обозначения антигенсвязывающего белка, например антитела, которое по существу не содержит других антигенсвязывающих белков, например антител (Ab), обладающих различной антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с HLA-A2:HPV16E7 или его фрагментом, по существу не содержит антигенсвязывающих белков, например антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от конформационного эпитопа HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7.

Используемый в настоящем описании термин "поверхностный плазмонный резонанс", относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать биомолекулярные взаимодействия в реальном времени путем обнаружения изменений в концентрациях белка в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Упсала, Швеция и Piscataway, Нью-Джерси).

Используемый в настоящем описании термин " $K_D$ " предназначен для обозначения константы равновесия диссоциации конкретного антигенсвязывающего взаимодействия белок-антиген.

Используемый в настоящем описании термин "перекрестно конкурирует" означает, что антигенсвязывающий белок, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с антигеном и ингибирует или блокирует связывание другого антигенсвязывающего белка, например антитела или его антигенсвязывающий фрагмент. Термин также включает конкуренцию между двумя антигенсвязываю-

щими белками, например антителами, в обеих ориентациях, т.е. первым антигенсвязывающим белком, например антителом, который связывает и блокирует связывание второго антигенсвязывающего белка, например антитела, и наоборот. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий белок, например антитело, и второй антигенсвязывающий белок, например антитело, могут связываться с одним и тем же эпитопом. Альтернативно, первый и второй антигенсвязывающие белки, например антитела, могут связываться с разными, но перекрывающимися эпитопами, так что связывание одного из них ингибирует или блокирует связывание второго, например, посредством стерического препятствия. Перекрестная конкуренция между антигенсвязывающими белками, например антителами, может быть измерена способами, известными в данной области, например, с помощью анализа интерферометрии биослоя в реальном времени без меток. Перекрестная конкуренция между двумя антигенсвязывающими белками, например антителами, может быть выражена как связывание второго антигенсвязывающего белка, например, антитела, которое меньше фонового сигнала из-за самосвязывания (где первый и второй антигенсвязывающие белки, например антитела, представляют собой один и тот же антигенсвязывающий белок, например антитело). Перекрестная конкуренция между 2 антигенсвязывающими белками, например антителами, может быть выражена, например, в виде % связывания второго антигенсвязывающего белка, например антитела, которое меньше, чем базовое фоновое самосвязывание (где первый и второй антигенсвязывающие белки, например антитела, представляют собой один и тот же антигенсвязывающий белок, например антитело).

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда он относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере примерно 90% и более предпочтительно по меньшей мере примерно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено любым известным алгоритмом измерения идентичности последовательности, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Идентичность последовательности может быть вычислена с использованием алгоритма, например, алгоритма Needleman Wunsch (Needleman and Wunsch 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) для глобального выравнивания или алгоритма Смита Уотермана (Smith and Waterman 1981, *J. Mol. Biol.* 147: 195-197) для локального выравнивания. Другой предпочтительный алгоритм описан Dufresne et al. в *Nature Biotechnology* в 2002 г. (vol. 20, pp. 1269-71) и используется в программном обеспечении GenePAST (GQ Life Sciences, Inc. Boston, MA).

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу сходный" означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, использующих веса пробелов по умолчанию, имеют идентичность последовательности по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой такую, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). В целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменит функциональных свойств белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства могут быть скорректированы в сторону увеличения, чтобы скорректировать консервативный характер замены. Средства для осуществления этой регуляции хорошо известны специалистам в данной области; см., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45, включенной в настоящее описание в качестве ссылки. "Умеренно консервативная" замена - это любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности, используя показатели сходства, назначенные различным заменам,

делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близко родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом; см., например, GCG Version 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программа в GCG Version 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательности областей наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См. также, например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Выражение "терапевтически эффективное количество" означает количество, которое обеспечивает желаемый эффект, для которого оно вводится. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет определено специалистом в данной области с использованием известных методов (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Используемый в настоящем описании термин "пациент" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, нуждающемуся в улучшении, профилактике и/или лечении заболевания или расстройства, такого как инфекция HPV, или HPV-ассоциированное заболевание или расстройство, такое как HPV-ассоциированное злокачественное новообразование (например, HPV16E7-положительное злокачественное новообразование). Термин включает людей, которые имеют или подвергаются риску HPV-ассоциированного заболевания, такого как HPV-ассоциированное злокачественное новообразование, метастатическое HPV-ассоциированное злокачественное новообразование, или инфекция HPV.

Используемый в настоящем описании термин "противоопухолевое лекарственное средство" означает любой агент, полезный для лечения или ослабления или ингибирования злокачественного новообразования, включая, но не ограничиваясь этим, цитотоксины и агенты, такие как антиметаболиты, алкилирующие агенты, антрациклины, антибиотики, антимиотические агенты, прокарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, кортикостероиды, циклофосфамид, митотан (O<sub>6</sub>P<sup>1</sup>-(DDD)), биологические препараты (например, антитела и интерфероны) и радиоактивные агенты. Используемый в настоящем описании термин "цитотоксин или цитотоксический агент" также относится к химиотерапевтическому агенту и означает любой агент, который вреден для клеток. Примеры включают Таксол® (паклитаксел), темозоламид, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, цисплатин, митомицин, этопосид, тенопосид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидрокси антрацин дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи.

Используемый в настоящем описании термин "противовирусное лекарственное средство" относится к любому лекарственному средству или терапии, используемому для лечения, профилактики или ослабления вирусной инфекции у пациента-хозяина. Термин "противовирусный препарат" включает, но не ограничивается ими, зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренц, кобицистат, тенофовир, рилпивирин, анальгетики и кортикостероиды.

Иммуноген, содержащий любое из следующего, можно использовать для генерирования антигенсвязывающих белков, например антител, к конформационному эпитопу HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7, например, пептида, содержащего аминокислотные остатки 11-19 или остатки 82-90 HPV16E7, связанные с HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, например антитела, по изобретению получают с использованием мышей, иммунизированных полноразмерным нативным белком HPV16E7 (см. номер доступа NCBI NP\_041326.1) (SEQ ID NO: 537) или рекомбинантным пептидом HPV16E7, таким как пептид, содержащий либо аминокислотные остатки 11-19 (YMLDLQPET; SEQ ID NO: 538) из GenBank номер доступа NP\_041326.1 (SEQ ID NO: 537), либо аминокислотные остатки 82-90 (LLMGTLGIV; SEQ ID NO: 539) GenBank, номер доступа NP041326.1 (SEQ ID NO: 537), связанным с HLA-A2.

Альтернативно, HPV16E7 или его фрагмент можно получить с использованием стандартных биохимических методов и модифицировать в контексте HLA-A2 и использовать в качестве иммуногена.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный пептид HPV16E7, экспрессируемый в *E.coli* или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, которые специфически связываются с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7, могут быть получены с использованием фрагментов вышеупомянутых областей или пептидов, которые простираются за пределы обозначенных областей примерно на 5-20 аминокислотных остатков со стороны одного или обоих N- или C-конца, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления лю-



бую комбинацию вышеуказанных областей или их фрагментов можно использовать при получении специфических антигенсвязывающих белков HLA-A2:HPV16E7, например антител.

Пептиды могут быть модифицированы для включения или замены определенных остатков для меченения или в целях конъюгации с молекулами-носителями, такими как KLH. Например, цистеин может быть добавлен либо на N-конце, либо на C-конце пептида, либо может быть добавлена линкерная последовательность для приготовления пептида для конъюгации, например, с KLH для иммунизации.

Неограничивающие иллюстративные анализы *in vitro* для измерения активности связывания проиллюстрированы в примерах настоящего описания. В Примере 4 аффинности связывания и кинетические константы специфических антигенсвязывающих белков человека против HLA-A2:HPV16E7, например, антител, определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса, и измерения проводили на приборе Biacore 4000 или T200. Примеры 6 и 7 описывают связывание антител с клетками, сверхэкспрессирующими фрагменты HPV16E7.

Антигенсвязывающие белки, например антитела, специфичные для HLA-A2:HPV16E7, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания локализация метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан этот пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевую биотин, будет ориентирован так, что C-концевая часть пептида будет дистальной к поверхности. В одном варианте осуществления метка может представлять собой радионуклид, флуоресцентный краситель или метку, обнаруживаемую с помощью МРТ. В некоторых вариантах осуществления такие меченые антигенсвязывающие белки можно использовать в диагностических анализах, включая анализы визуализации.

Антигенсвязывающие белки.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, которые включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и CAR (например, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR по изобретению) (описано ниже). Если специально не указано иное, термин "антитело", используемый в настоящем описании, следует понимать как охватывающий молекулы антитела, включающие две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (т.е. "полные молекулы антитела"), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное, используемые в настоящем описании, включают любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела", используемые в настоящем описании, относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7. Антигенсвязывающий белок, такой как фрагмент антитела, может включать Fab-фрагмент, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенные CDR. Антигенсвязывающие белки, такие как антигенсвязывающие фрагменты антитела, могут быть получены, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включая манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитела) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и подвергать манипуляциям химически или с помощью методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и так далее.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов антитела включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную область, определяющую комплементарность, (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как доменно-специфические антитела, однодоменные антитела, доменно-делеционные антитела, химерные антитела, CDR-трансплантированные антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), низкомолекулярные модулирующие иммунофармацевтические препараты (SMTP) и переменные домены IgNAR акул также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", при использовании в настоящем описании.

Антигенсвязывающий фрагмент антигенсвязывающего белка (например, антитела) обычно будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом или в рамке с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих

белках, имеющих домен  $V_H$ , связанный с доменом  $V_L$ , домены  $V_H$  и  $V_L$  могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры  $V_H-V_H$ ,  $V_H-V_L$  или  $V_L-V_L$ . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен  $V_H$  или  $V_L$ .

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению, включают: (i)  $V_H-C_{H1}$ ; (ii)  $V_H-C_{H2}$ ; (iii)  $V_H-C_{H3}$ ; (iv)  $V_H-C_{H1}-C_{H2}$ ; (v)  $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ ; (vi)  $V_H-C_{H2}-C_{H3}$ ; (vii)  $V_H-C_L$ ; (viii)  $V_L-C_{H1}$ ; (ix)  $V_L-C_{H2}$ ; (x)  $V_L-C_{H3}$ ; (xi)  $V_L-C_{H1}-C_{H2}$ ; (xii)  $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ ; (xiii)  $V_L-C_{H2}-C_{H3}$ ; и (xiv)  $V_L-C_L$ . В любой конфигурации переменного и константного доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменный и константный домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного домена, перечисленных выше в нековалентной ассоциации друг с другом, и/или с одним или более мономерными доменами  $V_H$  или  $V_L$  (например, дисульфидной связью (связями)).

Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие белки, например антигенсвязывающие фрагменты антитела, могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат полиспецифического антитела, включая иллюстративные форматы биспецифического антитела, раскрытые в настоящем описании, может быть адаптирован для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием рутинных методов, доступных в данной области.

Приготовление антигенсвязывающих белков.

Способы генерирования антигенсвязывающих белков, таких как антитела человека, у трансгенных мышей известны в данной области. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида E7 вируса папилломы человека (HPV) 16 (пептид HPV16E7).

Использование технологии VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любой другой известный способ получения антигенсвязывающих белков, например моноклональных антител, антигенсвязывающих белков с высокой аффинностью, например химерных антител к конформационному эпитопу HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7, изначально выделяют с переменной областью человека и константной областью мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает в себя создание трансгенной мыши с геномом, содержащим переменные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что мышь продуцирует антигенсвязывающий белок, например антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши в ответ на антигенную стимуляцию. Выделяют ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепи человека. Затем ДНК экспрессируется в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Обычно мышь VELOCIMMUNE® стимулируют интересующим антигеном, и лимфатические клетки (такие как В-клетки) выделяют у мышей, которые экспрессируют антигенсвязывающие белки, например антитела. Лимфатические клетки могут быть слиты с линией клеток миеломы для получения импортированных гибридных клеточных линий, и такие гибридные клеточные линии подвергают скринингу и селекционируют на предмет идентификации гибридных клеточных линий, которые продуцируют антитела, специфичные к интересующему антигену. ДНК, кодирующая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с желательными изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой антигенсвязывающий белок может продуцироваться в клетке, такой как клетка CHO. Альтернативно, ДНК, кодирующая антигенспецифические антигенсвязывающие белки, например химерные антитела, или переменные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Сначала выделяют высокоаффинные антигенсвязывающие белки, например химерные антитела, имеющие переменную область человека и константную область мыши. Как и в экспериментальном разделе ниже, антигенсвязывающие белки охарактеризованы и отобраны по желаемым характеристикам,

включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Константные области мыши заменены желаемой константной областью человека для генерации антигенсвязывающих белков, например полностью человеческих антител по изобретению, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированных. В то время как отобранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики высокой аффинности связывания антигена и специфичности к мишени находятся в варибельной области.

Биоэквиваленты.

Антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных антигенсвязывающих белков, например антител, но которые сохраняют способность связывать конформационный эпитоп HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7. Такие варианты антигенсвязывающих белков содержат одну или более вставок, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антигенсвязывающих белков. Аналогично, последовательности ДНК, кодирующие антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению, охватывают последовательности, которые включают одну или более вставок, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антигенсвязывающий белок, который по существу биоэквивалентен антигенсвязывающему белку по изобретению.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень абсорбции которых не показывают значительной разницы при введении в одной и той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, будь то однократная доза или несколько доз. Некоторые антигенсвязывающие белки или антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции и, тем не менее, могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражаются в маркировке, и не имеют существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при применении на постоянной основе, и считаются с медицинской точки зрения незначительными для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка (или антитела) являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте или эффективности.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка (или антитела) являются биоэквивалентными, если пациента можно переключать один или более раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка (или антитела) являются биоэквивалентными, если они оба действуют посредством общего механизма или механизмов действия для условия или условий использования, в той степени, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована методами *in vivo* и/или *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* на человеке или других млекопитающих, в котором концентрация антигенсвязывающего белка или его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функция времени; (b) тест *in vitro*, который был коррелирован с данными о биодоступности для человека *in vivo* и является достаточно прогнозируемым; (c) тест *in vivo* на человеке или других млекопитающих, в котором соответствующий немедленный фармакологический эффект антигенсвязывающего белка (или его мишени) измеряется как функция времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое исследование, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

Биоэквивалентные варианты антигенсвязывающих белков (или антител) по изобретению могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей или путем делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не существенные для биологической активности, могут быть делетированы или заменены другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать варианты антигенсвязывающих белков, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования антигенсвязывающих белков, например мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование. Антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, содержащие варианты Fc

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения предложены антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, например антитела, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антигенсвязывающего

белка с рецептором FcRn, например, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, содержащие мутацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3 Fc-домена, где мутация (мутации) увеличивает аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH колеблется от примерно 5,5 до примерно 6). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антигенсвязывающего белка в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация содержит модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация содержит модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, содержащие Fc-домен, содержащий мутацию S108P в шарнирной области IgG4, для стимулирования стабилизации димера. Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в переменных доменах антигенсвязывающего белка, раскрытых в настоящем описании, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C<sub>H</sub>), где химерная область C<sub>H</sub> содержит сегменты, полученные из областей C<sub>H</sub> иммуноглобулинов более чем одного изотипа. Например, антигенсвязывающие белки по изобретению могут содержать химерную область C<sub>H</sub>, содержащую часть или весь домен C<sub>H</sub>2, полученный из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с частью или всем доменом C<sub>H</sub>3, полученным из молекул человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающие белки по изобретению содержат химерную C<sub>H</sub>-область, имеющую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность "верхнего шарнира" (аминокислотные остатки в положениях с 216 по 227 согласно нумерации EU), полученную из области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4 в сочетании с "нижней шарнирной" последовательностью (аминокислотные остатки, соответствующие положениям 228-236 согласно нумерации EU), полученной из области петли человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира человеческого IgG1 или человеческого IgG4, и аминокислотные остатки, полученные из нижнего шарнира человеческого IgG2. Антигенсвязывающий белок, содержащий химерную C<sub>H</sub>-область, как описано в настоящем документе, может в некоторых вариантах осуществления проявлять модифицированные эффекторные функции Fc, не оказывая неблагоприятного влияния на терапевтические или фармакокинетические свойства антигенсвязывающего белка; (см., например, патентную публикацию США № 20140243504, раскрытие которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

Биологические характеристики антигенсвязывающих белков.

В общем, антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению функционируют путем связывания с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида E7 вируса папилломы человека (HPV) 16 (HPV16E7).

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, которые связываются с пептидом HPV16E7 в контексте HLA-A2 с высокой специфичностью. Антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7 не связываются с пептидом HPV16E7 в отсутствие HLA-A2. Кроме того, антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7 не связываются с нецелевым пептидом в контексте HLA-A2.

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, которые связываются с мономерным пептидом HLA-A2:HPV16E7 11-19 с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки, которые связываются с мономерным пептидом HLA-A2:HPV16E7 11-19 (например, при 25°C или при 37°C) с K<sub>D</sub> менее чем примерно 20 нМ, как



лиза Примера 7 настоящего описания, или с использованием по существу аналогичного анализа.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению полезны для ингибирования роста опухоли или задержки прогрессирования злокачественного новообразования при профилактическом введении пациенту, нуждающемуся в этом, и могут увеличить выживаемость пациента. Например, введение антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению может привести к сокращению первичной опухоли и может предотвратить метастазирование или развитие вторичных опухолей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению полезны для ингибирования роста опухоли при терапевтическом введении пациенту, нуждающемуся в этом, и могут увеличить выживаемость пациента. Например, введение пациенту терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего белка по изобретению может привести к сокращению и исчезновению установленной опухоли у пациента.

В одном варианте осуществления изобретение относится к его выделенному рекомбинантному антигенсвязывающему белку, который связывается с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7, где антигенсвязывающий белок проявляет одну или более из следующих характеристик: (i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 458, 474, 490, 506 и 522, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; (ii) содержит LCVR, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 466, 482, 498, 514 и 530, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; (iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 464, 480, 496, 512 и 528, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 472, 488, 504, 520 и 536, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; (iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 460, 476, 492, 508 и 524, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 468, 484, 500, 516 и 532, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую с ними по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 470, 486, 502, 518 и 534, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую с ними, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, при по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; (v) связывает мономерный HLA-A2:HPV16E7 11-19 с константой равновесия диссоциации ( $K_D$ ) менее чем примерно 20 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (vi) связывает мономерный пептид HLA-A2:HPV16E7 82-90 с константой равновесия диссоциации связывания ( $K_D$ ) менее чем примерно 25 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (vii) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:HPV16E7 11-19, с  $EC_{50}$  менее чем примерно 6 нМ и не связывается с клетками, экспрессирующими предсказанные нецелевые пептиды, как определено с помощью люминесцентного анализа; (viii) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:HPV16E7 82-90, с  $EC_{50}$  менее чем мерно 1 нМ и по существу не связывается с клетками, экспрессирующими предсказанные нецелевые пептиды, как определено с помощью люминесцентного анализа; (ix) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:HPV16E7 11-19, с  $EC_{50}$  менее чем примерно 30 нМ, как определено анализом проточной цитометрии; (x) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:HPV16E7 82-90, с  $EC_{50}$  менее чем примерно 75 нМ, как определено

анализом проточной цитометрии; (xi) не связывается с HLA-A2-презентированным нецелевым пептидом, где пептид отличается на 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот от SEQ ID NO: 538; и (xii) не связывается с HLA-A2-презентированным нецелевым пептидом, где пептид отличается на 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот от SEQ ID NO: 539.

Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут обладать одной или более из вышеуказанных характеристик или любой их комбинацией. Другие биологические характеристики антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению будут очевидны для специалиста в данной области из обзора настоящего раскрытия, включая рабочие примеры, приведенные в настоящем описании.

Эпитопное картирование и связанные технологии.

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, которые взаимодействуют с одной или более аминокислотами, обнаруженными в одном или более доменах HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7. Эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных внутри одного или обоих вышеуказанных доменов молекулы HPV16E7 (например, конформационного эпитопа).

Различные методы, известные специалистам в данной области, могут быть использованы для определения того, "взаимодействует ли антигенсвязывающий белок с одной или более аминокислотами" внутри полипептида или белка. Иллюстративные методы включают, например, рутинные анализы перекрестного блокирования, такие как описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие методы включают в себя аланин-сканирующий мутационный анализ, анализ с использованием пептидного блота (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и анализ ЯМР. Кроме того, могут быть использованы такие методы, как удаление эпитопа, выделение эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Другим методом, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антигенсвязывающий белок, является обмен водород/дейтерий, детектируемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, метод обмена водород/дейтерий включает мечение дейтерием интересующего белка с последующим связыванием антигенсвязывающего белка с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антигенсвязывающий белок переносится в воду, и обменные протоны в аминокислотах, которые защищены антигенсвязывающим белковым комплексом, подвергаются обратному обмену дейтерий-водород с более медленной скоростью, чем обменные протоны в аминокислотах, которые не являются частью интерфейса. В результате аминокислоты, которые образуют часть интерфейса белок/антигенсвязывающий белок, могут сохранять дейтерий и, следовательно, демонстрируют относительно большую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в интерфейс. После диссоциации антигенсвязывающего белка целевой белок подвергается расщеплению протеазой и анализу масс-спектрометрии, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют специфическим аминокислотам, с которыми взаимодействует антигенсвязывающий белок; см., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, на который отвечают В и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, которые становятся смежными при третичном сворачивании белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичным сворачиванием, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает, по меньшей мере, 3, а более часто, по меньшей мере, 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Профилирование с помощью модификации (MAP), также известное как профилирование антител на основе структуры антигена (ASAP), представляет собой метод, который классифицирует большое количество моноклональных антигенсвязывающих белков, например антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, в соответствии со сходством профиля связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными антигенными поверхностями (см. US 2004/0101920, полностью включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, явно отличающийся от эпитопа, представленного другой категорией, или частично перекрывающийся с ним. Эта технология позволяет быстро фильтровать генетически идентичные антигенсвязывающие белки, так что характеристика может быть сфокусирована на генетически отличных антигенсвязывающих белках. При применении к скринингу гибридом MAP может облегчать идентификацию редких клонов гибридомы, которые продуцируют антигенсвязывающие белки, имеющие желаемые характеристики. MAP может использоваться для сортировки антигенсвязывающих белков по изобретению на группы антигенсвязывающих белков, связывающих разные эпитопы.

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, которые связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любой из конкретных иллюстративных антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем документе в табл. 1, или антигенсвязывающий белок, имеющий последовательности CDR любого из иллюстративных антигенсвязывающих белков, описанных в табл. 1. Аналогично, настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие белки против

HLA-A2:HPV16E7, которые конкурируют за связывание с HLA-A2:HPV16E7 или его фрагментом с любым из конкретных иллюстративных антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем документе в табл. 1, или антигенсвязывающий белок, имеющий последовательности CDR любого из иллюстративных антигенсвязывающих белков, описанных в табл. 1.

Можно легко определить, связывается ли антигенсвязывающий белок с тем же эпитопом, или конкурирует за связывание с эталонным антигенсвязывающим белком против HLA-A2:HPV16E7, с помощью рутинных методов, известных в данной области. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемый антигенсвязывающий белок с тем же эпитопом, что и эталонный антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению, эталонному антигенсвязывающему белку разрешается связываться с белком или пептидом HLA-A2:HPV16E7 в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестируемого антигенсвязывающего белка связываться с молекулой HLA-A2:HPV16E7. Если тестируемый антигенсвязывающий белок способен связываться с HLA-A2:HPV16E7 после насыщенного связывания с эталонным антигенсвязывающим белком против HLA-A2:HPV16E7, можно сделать вывод, что тестируемый антигенсвязывающий белок связывается с другим эпитопом, чем эталонный антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7. С другой стороны, если тестируемый антигенсвязывающий белок не способен связываться с белком HLA-A2:HPV16E7 после насыщенного связывания с эталонным антигенсвязывающим белком против HLA-A2:HPV16E7, то тестируемый антигенсвязывающий белок может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный с антигенсвязывающим белком против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению.

Чтобы определить, конкурирует ли антигенсвязывающий белок за связывание с эталонным антигенсвязывающим белком против HLA-A2:HPV16E7, описанная выше методика связывания выполняется в двух ориентациях: в первой ориентации эталонному антигенсвязывающему белку разрешается связывание с белком HLA-A2:HPV16E7 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антигенсвязывающего белка с молекулой HLA-A2:HPV16E7. Во второй ориентации тестируемый антигенсвязывающий белок связывается с молекулой HLA-A2:HPV16E7 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антигенсвязывающего белка с молекулой HLA-A2:HPV16E7. Если в обеих ориентациях только первый (насыщающий) антигенсвязывающий белок способен связываться с молекулой HLA-A2:HPV16E7, то делается вывод, что тестируемый антигенсвязывающий белок и эталонный антигенсвязывающий белок конкурируют за связывание HLA-A2:HPV16E7. Как будет понятно специалисту в данной области, антигенсвязывающий белок, который конкурирует за связывание с эталонным антигенсвязывающим белком, необязательно может связываться с идентичным эпитопом, что и эталонный антигенсвязывающий белок, но может стерически блокировать связывание эталонного антигенсвязывающего белка путем связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждый конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализ конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990, 50: 1495-1502). Альтернативно, два антигенсвязывающих белка имеют один и тот же эпитоп, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антигенсвязывающих белка имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого.

Затем можно провести дополнительные рутинные эксперименты (например, пептидные мутации и анализы связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антигенсвязывающего белка связано со связыванием с тем же эпитопом, что и у эталонного антигенсвязывающего белка, или стерическое блокирование (или другое явление) является причиной отсутствия наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ИФА, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антигенсвязывающего белка, доступного в данной области.

Иммуноконъюгаты.

Изобретение включает антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, конъюгированные с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как цитотоксин или химиотерапевтическое средство для лечения злокачественного новообразования. Используемый в настоящем описании термин "иммуноконъюгат" относится к антигенсвязывающему белку, который химически или биологически связан с цитотоксином, радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, мишенью или репортерным фрагментом, таким как детектируемый фрагмент, фермент, токсин, пептид или белок или терапевтический агент. Антигенсвязывающий белок может быть связан с цитотоксином, радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, мишенью или репортерным фрагментом, ферментом, токсином, пептидом или терапевтическим агентом в любом месте молекулы, если он способен связывать свою мишень. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антигенсвязывающий белок-лекарственное средство и



слитые белки антигенсвязывающий белок-токсин. В одном варианте осуществления агент может представлять собой второе отличающееся антитело к HPV16E7 или HLA-A2:HPV16E7. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок может быть конъюгирован с агентом, специфичным для опухолевой клетки или клетки, инфицированной вирусом, т.е. клетки, инфицированной HPV. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антигенсвязывающим белком против HLA-A2:HPV16E7 и будет учитывать состояние, подлежащее лечению, и желаемый терапевтический эффект, который должен быть достигнут. Примеры подходящих агентов для образования иммуноконъюгатов известны в данной области; см., например, публикацию PCT № WO 05/103081.

Химерные антигенные рецепторы (CAR).

Химерные антигенные рецепторы (CAR) перенаправляют специфичность Т-клеток к распознаваемым антителами антигенам, экспрессируемым на поверхности опухолевых клеток, тогда как Т-клеточные рецепторы (TCR) расширяют диапазон мишеней, включая внутриклеточные антигены опухоли. CAR-перенаправленные Т-клетки, специфичные для В-клеточного антигена дифференцировки CD19, показали значительную эффективность в лечении В-клеточных злокачественных опухолей, в то время как TCR-перенаправленные Т-клетки продемонстрировали преимущества у пациентов, страдающих солидным раком. Stauss et al. описывают стратегии модификации терапевтических CAR и TCR для использования при лечении злокачественного новообразования, например, для усиления антигенспецифической эффекторной функции и ограничения токсичности сконструированных Т-клеток (Current Opinion in Pharmacology 2015, 24: 113-118).

Один аспект изобретения включает химерный антигенный рецептор (CAR), который специфичен для пептида HPV16E7, презентуемого на поверхности опухолевых клеток с помощью HLA-A2, такого как пептид, содержащий аминокислотные остатки 11-19 или 82-90 HPV16E7. В одном варианте осуществления настоящего изобретения CAR, как описано в настоящем документе, содержит внеклеточный специфичный для мишени связывающий домен, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен (такой как сигнальный домен, полученный из CD3зета или FcR-гамма) и/или один или более костимулирующих сигнальных доменов, полученных из костимулирующей молекулы, такой как, но не ограничиваясь этим, CD28, CD137, CD134 или CD278. В одном варианте осуществления CAR включает шарнирную или спейсерную область между внеклеточным связывающим доменом и трансмембранным доменом, как, например, шарнир CD8-альфа. В другом варианте осуществления настоящего изобретения CAR, как описано в настоящем документе, содержит внеклеточный специфический для мишени связывающий домен и константный домен Т-клеточного рецептора ("конструкция Т-тела").

Следует понимать, что для использования в любом из CAR, описанных в настоящем документе, внеклеточный специфический для мишени связывающий домен может содержать Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>, Fv или одноцепочечный Fv (scFv) антигенсвязывающего белка по изобретению.

Используемый в настоящем описании связывающий домен или внеклеточный домен CAR обеспечивает CAR способностью связываться с целевым антигеном, представляющим интерес. Связывающим доменом может быть любой белок, полипептид, олигопептид или пептид, который обладает способностью специфически распознавать и связываться с биологической молекулой (например, рецептором клеточной поверхности или опухолевым белком или его компонентом). Связывающий домен включает любой встречающийся в природе синтетический, полусинтетический или рекомбинантно полученный партнер по связыванию для представляющей интерес биологической молекулы. Например, и, как дополнительно описано в настоящем документе, связывающий домен может представлять собой переменные области легкой цепи и тяжелой цепи антитела, или переменные области легкой и тяжелой цепи могут быть соединены вместе в одну цепь и в любой ориентации (например, VL-VH или VH-VL). Известно множество анализов для идентификации связывающих доменов по настоящему изобретению, которые специфически связываются с конкретной мишенью, включая вестерн-блот, ИФА, проточную цитометрию или анализ поверхностного плазмонного резонанса (например, с использованием анализа BIACORE), и они описаны в настоящем документе. Мишенью может быть любой антиген, представляющий клинический интерес, против которого было бы желательно инициировать эффекторный иммунный ответ, который приводит к уничтожению опухоли. В одном варианте осуществления целевой антиген связывающего домена химерного антигенного рецептора представляет собой конформационный эпитоп HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7 на поверхности опухолевых клеток, такого как пептид, содержащий аминокислотные остатки 11-19 или 82-90 HPV16E7.

Иллюстративные связывающие домены включают антигенсвязывающие белки, такие как антигенсвязывающие фрагменты антитела, такие как scFv, scTCR, внеклеточные домены рецепторов, лиганды для молекул/рецепторов клеточной поверхности или их рецепторсвязывающие домены и белки, связывающие опухоль. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены, включенные в CAR по изобретению, могут представлять собой переменную область (Fv), CDR, Fab, scFv, VH, VL, вариант домена антитела (dAb), верблюжье антитело (VHH), вариант домена фибронектина 3, вариант повтора анкирина и другой антигенспецифический связывающий домен, полученный из других белковых каркасов.

В одном варианте осуществления связывающий домен CAR представляет собой одноцепочечное антитело против HLA-A2:HPV16E7 (scFv) и может представлять собой мышинный, человеческий или гу-

манизированный scFv. Одноцепочечные антитела могут быть клонированы из генов V-области гибридомы, специфичной для желаемой мишени. Метод, который можно использовать для клонирования вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), был описан, например, в Orlandi et al., PNAS, 1989; 86: 3833-3837. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления связывающий домен содержит связывающий домен, полученный из антитела, но может представлять собой связывающий домен, полученный не из антитела. Связывающий домен, полученный из антитела, может представлять собой фрагмент антитела или генно-инженерный продукт одного или более фрагментов антитела, причем этот фрагмент участвует в связывании с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению могут содержать линкер между различными доменами, добавляемый для соответствующего расстояния и конформации молекулы. Например, в одном варианте осуществления между связывающим доменом VH или VL может существовать линкер, длина которого может составлять 1-10 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер между любыми доменами химерного антигенного рецептора может иметь длину от 1 до 20 или 20 аминокислот. В связи с этим линкер может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер может иметь длину 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. Диапазоны, включающие числа, описанные в настоящем документе, также включены в настоящий документ, например, линкер длиной 10-30 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления линкеры, подходящие для использования в CAR, описанном здесь, являются гибкими линкерами. Подходящие линкеры могут быть легко выбраны и могут быть любой подходящей различной длины, как, например от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот кислоты, включая от 4 до 10 аминокислот, от 5 до 9 аминокислот, от 6 до 8 аминокислот или от 7 до 8 аминокислот и могут составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

Типичные гибкие линкеры включают глициновые полимеры (G)<sub>n</sub>, глицин-сериновые полимеры, где n представляет собой целое число, по меньшей мере, один, глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Глициновые и глицин-сериновые полимеры являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут быть в состоянии служить в качестве нейтрального троса между доменами слитых белков, такими как CAR, описанные в настоящем документе. Глицин получает доступ к значительно большему количеству phi-psi-пространства, чем даже аланин, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Специалист в данной области техники поймет, что конструкция CAR может включать в себя линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может включать в себя гибкий линкер, а также одну или более частей, которые придают менее гибкую структуру для обеспечения желаемой структуры CAR.

За доменом связывания CAR может следовать "спейсер" или "шарнир", который относится к области, которая отодвигает антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторных клеток, чтобы обеспечить надлежащий контакт клетка/клетка, связывание антигена и активацию (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). Шарнирная область в CAR обычно находится между трансмембранным (TM) и связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и может представлять собой шарнирную область иммуноглобулина дикого типа или измененную шарнирную область иммуноглобулина дикого типа. Другие примерные шарнирные области, используемые в CAR, описанных в настоящем документе, включают шарнирные области, полученные из внеклеточных областей мембранных белков типа 1, таких как CD8-альфа, CD4, CD28 и CD7, которые могут быть шарнирными областями дикого типа из этих молекул или могут быть изменены. В одном варианте осуществления шарнирная область содержит шарнир CD8-альфа.

"Трансмембранная" область или домен является частью CAR, которая прикрепляет участок внеклеточного связывания к плазматической мембране иммунной эффекторной клетки и облегчает связывание связывающего домена с антигеном-мишенью. Трансмембранный домен может представлять собой CD3-зета-трансмембранный домен, однако другие трансмембранные домены, которые можно использовать, включают в себя домены, полученные из CD8-альфа, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В одном варианте осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD137. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является синтетическим, и в этом случае он будет содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

"Внутриклеточный сигнальный домен" относится к части белка химерного антигенного рецептора, которая участвует в передаче сообщения об эффективном связывании CAR с антигеном-мишенью во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки, чтобы вызвать эффекторную функцию клеток, например, активацию цитокина, продукцию, пролиферацию и цитотоксическую активность, включая высвобождение цитотоксических факторов в CAR-связанную клетку-мишень, или другие клеточные ответы, вызванные антигенным связыванием с внеклеточным CAR-доменом. Термин "эффекторная функция" относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или помощь или активность, включающую секрецию

цитокина. Таким образом, термин "внутриклеточный сигнальный домен" относится к части белка, которая преобразует сигнал эффекторной функции и которая направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя обычно можно использовать весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать весь домен. В той степени, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо всего домена до тех пор, пока он передает сигнал эффекторной функции. Термин "внутриклеточный сигнальный домен" подразумевает включение любой усеченной части внутриклеточного сигнального домена, достаточной для передачи сигнала эффекторной функции. Внутриклеточный сигнальный домен также известен как "домен сигнальной трансдукции" и, как правило, имеет происхождение из частей человеческих цепей CD3 или Fc $\gamma$ .

Известно, что сигналов, генерируемых только через рецептор Т-клеток, недостаточно для полной активации Т-клеток и что также необходим вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредуется двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антиген-зависимую первичную активацию через Т-клеточный рецептор (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности регулируют первичную активацию Т-клеточного рецепторного комплекса либо путем ингибирования, либо путем активирования. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют костимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина или ITAM.

Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые конкретно используются в изобретении, включают в себя последовательности, полученные из TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR против HLA-A2:HPV16E7, описанных в настоящем документе, имеет происхождение из CD3-дзета или FcR-гамма.

Используемый в настоящем описании термин "костимулирующий сигнальный домен" или "костимулирующий домен" относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от рецепторов антигена или рецепторов Fc, которые обеспечивают второй сигнал, необходимый для эффективной активации и функционирования Т-лимфоцитов при связывании с антигеном. Примеры таких костимулирующих молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, B7-H2 и лиганд, который специфически связывается с CD83. Соответственно, хотя в настоящем раскрытии предложены иллюстративные костимулирующие домены, полученные из CD3-дзета и 4-1BB, другие костимулирующие домены предполагаются для использования с CAR, описанными в настоящем документе. Включение одного или более костимулирующих сигнальных доменов может усилить эффективность и экспансию Т-клеток, экспрессирующих рецепторы CAR. Внутриклеточные сигнальные и костимулирующие сигнальные домены могут быть связаны в любом порядке в тандеме с карбоксильным концом трансмембранного домена.

Хотя было показано, что CAR на основе scFv, сконструированные так, чтобы содержать сигнальный домен от CD3 или FcR-гамма, доставляют мощный сигнал для активации Т-клеток и эффекторной функции, их недостаточно для того, чтобы вызывать сигналы, которые способствуют выживанию и экспансии Т-клеток в отсутствие сопутствующего костимулирующего сигнала. Другие CAR, содержащие связывающий домен, шарнир, трансмембранный и сигнальный домен, полученные из CD3-дзета или FcR-гамма вместе с одним или более костимулирующими сигнальными доменами (например, внутриклеточные костимулирующие домены, полученные из CD28, CD137, CD134 и CD278), могут более эффективно направлять противоопухолевую активность, а также повышенную секрецию цитокинов, литическую активность, выживаемость и пролиферацию в CAR-экспрессирующих Т-клетках *in vitro*, а также на животных моделях и у онкологических пациентов (Milone et al., *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong et al., *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito et al., *PNAS*, 2009; 106: 3360-3365).

В одном варианте осуществления CAR HLA-A2:HPV16E7 по изобретению содержат (a) scFv против HLA-A2:HPV16E7 в качестве связывающего домена (например, scFv, имеющий области связывания (например, CDR или переменные домены) из любого одного или более антител HLA-A2:HPV16E7, описанных в табл. 1) (b) шарнирную область, полученную из человеческого CD8-альфа, (c) трансмембранный домен человеческого CD8-альфа и (d) внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета-цепи человеческого Т-клеточного рецептора (CD3) и, необязательно, один или более костимулирующих сигнальных доменов, полученных из CD28, CD137, CD134 и CD278. В одном варианте осуществления разные белковые домены расположены от аминоконца до карбоксильного конца в следующем порядке: связывающий домен, шарнирная область и трансмембранный домен. Внутриклеточный сигнальный домен и необязательные костимулирующие сигнальные домены связаны с трансмембранным карбокси-концом в любом порядке в тандеме с образованием одноцепочечного химерного полипептида. В одном варианте осуще-

ствления конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующей HLA-A2:HPV16E7 CAR, представляет собой химерную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую различные кодирующие последовательности, например (от 5' к 3') кодирующие последовательности человеческого scFv против HLA-A2:HPV16E7, шарнир CD8-альфа человека, трансмембранный домен CD8-альфа человека и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. В другом варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая HLA-A2:HPV16E7 CAR, представляет собой химерную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую различные кодирующие последовательности, например (от 5' к 3'), кодирующие последовательности человеческого scFv против HLA-A2:HPV16E7, шарнир CD8-альфа человека, трансмембранный домен CD8-альфа человека, костимулирующий домен CD137 и костимулирующий домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая HLA-A2:HPV16E7 CAR, представляет собой химерную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую различные кодирующие последовательности, например (от 5' к 3'), кодирующие последовательности человеческого scFv против HLA-A2:HPV16E7, шарнир CD8-альфа человека, трансмембранный домен CD8-альфа человека, костимулирующий домен CD137 и костимулирующий домен CD3-дзета, где scFv против HLA-A2:HPV16E7 содержит VH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 34, 82, 194, 282 и 506, и VL, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 42, 90, 202, 290 и 514. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует HLA-A2:HPV16E7 CAR, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 540, 541, 542, 543, 544 и 545.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий CAR, описанный в настоящем документе, вставлен в вектор. Используемый в настоящем описании термин "вектор" относится к носителю, в который может быть ковалентно встроен полинуклеотид, кодирующий белок, для экспрессии этого белка и/или клонирования полинуклеотида. Такие векторы также могут упоминаться как "экспрессирующие векторы". Выделенный полинуклеотид может быть вставлен в вектор с использованием любых подходящих способов, известных в данной области, например, без ограничения, вектор может быть гидролизован с использованием соответствующих рестрикционных ферментов и затем может быть лигирован с выделенным полинуклеотидом, имеющим совпадающие концы рестрикции. Экспрессирующие векторы обладают способностью включать и экспрессировать гетерологичные или модифицированные последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие по меньшей мере часть генного продукта, способного транскрибироваться в клетке. В большинстве случаев молекулы РНК затем транслируются в белок. Экспрессирующие векторы могут содержать множество контрольных последовательностей, которые относятся к последовательностям нуклеиновой кислоты, необходимым для транскрипции и, возможно, трансляции функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. В дополнение к контрольным последовательностям, которые управляют транскрипцией и трансляцией, векторы и экспрессирующие векторы могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые также выполняют другие функции и обсуждаются ниже. Экспрессирующий вектор может содержать дополнительные элементы, например, экспрессирующий вектор может иметь две системы репликации, что позволяет поддерживать его в двух организмах, например для экспрессии в клетках человека и для клонирования и амплификации в прокариотическом хозяине.

Экспрессирующий вектор может иметь необходимые регуляторные элементы, расположенные в 5'-области и в 3'-области, такие как промоторные последовательности, такие как CMV, PGK и EF1-альфа, промоторы, ТАТА-бокс, блок распознавания и связывания рибосом, и последовательность терминации транскрипции 3'-UTR AAUAAA для эффективной транскрипции и трансляции гена в соответствующей клетке-хозяине. Другие подходящие промоторы включают конститутивный промотор раннего промотора обезьяньего вируса 40 (SV40), вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор HIV LTR, промотор MoMuLV, промотор вируса птичьего лейкоза, немедленный ранний промотор EBV и промотор вируса саркомы Рауса. Можно также использовать промоторы генов человека, включая, но не ограничиваясь этим, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. В некоторых вариантах осуществления индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть векторов, экспрессирующих химерный антигенный рецептор. Это обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать или отключать экспрессию представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. Примеры индуцируемых промоторов включают, но не ограничиваются ими, металлотиониновый промотор, глюкокортикоидный промотор, прогестероновый промотор или тетрациклиновый промотор.

Экспрессирующий вектор может иметь дополнительную последовательность, такую как метка бх-гистидин, с-Мус и FLAG, которые включены в экспрессируемые CAR. Таким образом, экспрессирующий вектор может быть сконструирован так, чтобы он содержал 5'- и 3'-нетранслируемые регуляторные последовательности, которые иногда могут функционировать в качестве энхансерных последовательностей, промоторных областей и/или терминаторных последовательностей, которые могут облегчать или усиливать эффективную транскрипцию представляющей интерес нуклеиновой кислоты (кислот), которая вставлена в экспрессирующий вектор. Экспрессирующий вектор также может быть сконструирован для

репликации и/или функциональности экспрессии (например, транскрипции и трансляции) в конкретном типе клеток, локации клеток или типе ткани. Экспрессирующие векторы могут включать маркер селекции для поддержания вектора в клетке-хозяине или реципиенте.

Примерами векторов являются плазмиды, автономно реплицирующиеся последовательности и транспозируемые элементы. Дополнительные иллюстративные векторы включают, без ограничения, плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как искусственная дрожжевая хромосома (YAC), искусственная бактериальная хромосома (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13 и вирусы животных. Примеры категорий вирусов животных, полезных в качестве векторов, включают, без ограничения, ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, вирус папилломы и паповавирус (например, SV40). Примерами экспрессирующих векторов являются векторы Lenti-XTM бицистронной экспрессирующей системы (Neo) (Clontch), векторы pCneo (Promega) для экспрессии в клетках млекопитающих; pLenti4/V5-DEST.TM., pLenti6/V5-DEST.TM. и pLenti6.2N5-GW/lacZ (Invitrogen) для лентивирус-опосредованного переноса и экспрессии генов в клетках млекопитающих. Кодированные последовательности CAR, раскрытые в настоящем описании, могут быть лигированы в такие экспрессирующие векторы для экспрессии химерного белка в клетках млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по настоящему изобретению, представлены в вирусных векторах. Вирусный вектор может представлять собой вектор, полученный из ретровируса, лентивируса или пенящего вируса. Используемый в настоящем описании термин "вирусный вектор" относится к векторной конструкции нуклеиновой кислоты, которая включает в себя по меньшей мере один элемент вирусного происхождения и обладает способностью упаковываться в вирусную частицу вектора. Вирусный вектор может содержать кодирующую последовательность для различных химерных белков, описанных в настоящем документе, вместо несущественных вирусных генов. Вектор и/или частица могут быть использованы с целью переноса ДНК, РНК или других нуклеиновых кислот в клетки либо *in vitro*, либо *in vivo*. В данной области известны многочисленные формы вирусных векторов.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор, содержащий кодирующую последовательность для CAR, описанного в настоящем документе, представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Термин "ретровирусный вектор" относится к вектору, содержащему структурные и функциональные генетические элементы, которые в основном получены из ретровируса. Термин "лентивирусный вектор" относится к вектору, содержащему структурные и функциональные генетические элементы вне LTR, которые в основном получены из лентивируса.

Ретровирусные векторы для использования в настоящем описании могут быть получены из любого известного ретровируса (например, ретровирусов типа с, таких как вирус мышины саркомы Молони (MoMSV), вирус мышины саркомы Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мыши (MuMTV), вирус лейкоза гиббонов (GaLV), вируса лейкоза кошек (FLV), спумавируса, вируса Friend, мышинового вируса стволовых клеток (MSCV) и вируса саркомы Рауса (RSV)). "Ретровирусы" по изобретению также включают вирусы Т-клеточного лейкоза человека, HTLV-1 и HTLV-2, и лентивирусное семейство ретровирусов, такие как вирусы иммунодефицита человека, HIV-1, HIV-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), кошачий вирус иммунодефицита (FIV), вирус иммунодефицита лошади (EIV) и другие классы ретровирусов.

Лентивирусный вектор для использования в настоящем описании относится к вектору, полученному из лентивируса, группы (или рода) ретровирусов, которые вызывают медленно развивающееся заболевание. Вирусы, включенные в эту группу, включают HIV (вирус иммунодефицита человека; включая HIV типа 1 и HIV типа 2); висна-маеди; вирус козьего артрита-энцефалита; вирус инфекционной анемии лошадей; вирус иммунодефицита кошек (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV); и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Приготовление рекомбинантного лентивируса может быть достигнуто с использованием способов согласно Dull et al. и Zufferey et al. (Dull et al., *J. Virol.*, 1998; 72: 8463-8471 и Zufferey et al., *J. Virol.* 1998; 72: 9873-9880).

Ретровирусные векторы (т.е. как лентивирусные, так и не лентивирусные) для использования в настоящем изобретении могут быть получены с использованием стандартных методов клонирования путем объединения желаемых последовательностей ДНК в порядке и ориентации, описанных в настоящем документе (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, FM et al., (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14 and other standard laboratory manuals; Eglitis, et al. (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) *Science* 254: 1802-1805; van Beusechem et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644; Kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) *J. Immunol* 150:4104-4115; патент США No. 4868116; патент США № 4980286; заявка PCT WO 89/07136; заявка PCT WO 89/02468; заявка PCT WO 89/05345 и заявка PCT WO

92/07573).

Подходящие источники для получения ретровирусных (т.е. как лентивирусных, так и нелентивирусных) последовательностей для использования при формировании векторов включают, например, геномные РНК и кДНК доступные из коммерчески доступных источников, включая коллекцию типовых культур (ATCC), Rockville, Md. Последовательности также могут быть синтезированы химически.

Для экспрессии HLA-A2:HPV16E7 CAR вектор может быть введен в клетку-хозяина, чтобы обеспечить экспрессию полипептида в клетке-хозяине. Экспрессирующие векторы могут содержать множество элементов для контроля экспрессии, включая, без ограничения, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, селективируемые маркеры и сигнальные последовательности. Эти элементы могут быть выбраны соответствующим образом специалистом в данной области, как описано выше. Например, последовательности промотора могут быть выбраны для стимулирования транскрипции полинуклеотида в векторе. Подходящие промоторные последовательности включают, без ограничения, промотор T7, промотор T3, промотор SP6, бета-актиновый промотор, промотор EF1a, промотор CMV и промотор SV40. Последовательности энхансера могут быть выбраны для усиления транскрипции полинуклеотида. Селективируемые маркеры могут быть выбраны, чтобы позволить отбор клеток-хозяев, в которые вставлен вектор, из тех, в которые вектор не вставлен, например, селективируемыми маркерами могут быть гены, которые придают устойчивость к антибиотикам. Сигнальные последовательности могут быть выбраны так, чтобы экспрессируемый полипептид мог транспортироваться за пределы клетки-хозяина.

Для клонирования полинуклеотида вектор может быть введен в клетку-хозяин (выделенную клетку-хозяин), чтобы обеспечить репликацию самого вектора и тем самым амплифицировать копии содержащегося в нем полинуклеотида. Векторы клонирования могут содержать компоненты последовательности, как правило, без ограничения, включая последовательность начала репликации, последовательности промотора, последовательности инициации транскрипции, последовательности энхансера и селективируемые маркеры. Эти элементы могут быть выбраны соответствующим образом специалистом в данной области. Например, последовательность начала репликации может быть выбрана для стимулирования автономной репликации вектора в клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие относится к выделенным клеткам-хозяевам, содержащим векторы, представленные в настоящем документе. Клетки-хозяева, содержащие вектор, могут быть полезны для экспрессии или клонирования полинуклеотида, содержащегося в векторе. Подходящие клетки-хозяева могут включать, без ограничения, прокариотические клетки, грибковые клетки, дрожжевые клетки или клетки высших эукариот, такие как клетки млекопитающих. Подходящие прокариотические клетки для этой цели включают, без ограничения, эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *Enterobacteriaceae*, такие как *Escherichia*, например, *E.coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*.

CAR по настоящему изобретению вводят в клетку-хозяина с использованием методов трансфекции и/или трансдукции, известных в данной области. Используемые в настоящем описании термины "трансфекция" и "трансдукция" относятся к процессам, посредством которых последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты вводится в клетку-хозяина. Нуклеиновая кислота может быть интегрирована в ДНК клетки-хозяина или может поддерживаться внехромосомно. Нуклеиновая кислота может поддерживаться транзитивно или может вводиться стабильно. Трансфекция может быть осуществлена различными способами, известными в данной области, включая, без ограничения, кальцийфосфатную преципитацию совместно с ДНК, DEAE-декстран-опосредованную трансфекцию, полибрен-опосредованную трансфекцию, электропорацию, микроинъекцию, слияние липосом, липофекцию, слияние протопластов, ретровирусную инфекцию и биолистику. Трансдукция относится к доставке гена (генов) с использованием вирусного или ретровирусного вектора посредством вирусной инфекции, а не путем трансфекции. В некоторых вариантах осуществления ретровирусные векторы трансдуцируют путем упаковки векторов в вирионы до контакта с клеткой. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая CAR против HLA-A2:HPV16E7, переносимый ретровирусным вектором, может быть трансдуцирована в клетку посредством инфекции и интеграции вируса.

Используемый в настоящем описании термин "генно-инженерный" или "генетически модифицированный" относится к добавлению дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал в клетке.

Термины "генетически модифицированные клетки", "модифицированные клетки" и "перенаправленные клетки" используются взаимозаменяемо.

В частности, CAR по настоящему изобретению вводят и экспрессируют в иммунных эффекторных клетках, чтобы перенаправить их специфичность на интересующий антиген-мишень, например конформационный эпитоп HLA-A2-презентированного пептида HPV16E7, например, аминокислотные остатки 11-19 или 82-90.

Настоящее изобретение относится к способам получения иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют CAR, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления способ

включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных от пациента, такого как пациент, имеющий заболевание или расстройство, ассоциированное с HPV16E7, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или более CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки выделяют у индивидуума и генетически модифицируют без дополнительных манипуляций *in vitro*. Такие клетки затем могут быть повторно непосредственно введены индивидууму. В других вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки сначала активируют и стимулируют к пролиферации *in vitro* перед их генетической модификацией для экспрессии CAR. В этом отношении иммунные эффекторные клетки могут культивироваться до или после генетической модификации (т.е. трансдуцироваться или трансфецироваться для экспрессии CAR, как описано в настоящем документе).

До манипуляций *in vitro* или генетической модификации иммунных эффекторных клеток, описанных в настоящем документе, источник клеток может быть получен от пациента. В частности, иммунные эффекторные клетки для использования с CAR, как описано в настоящем документе, содержат Т-клетки. Такие рекомбинантные Т-клетки обозначаются здесь как "Т-тела".

В одном варианте осуществления настоящего изобретения Т-тело включает CAR по изобретению, содержащий внеклеточный специфичный для мишени связывающий домен, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен (такой как сигнальный домен, полученный из CD3-дзета или FcR-гамма), и/или один или более костимулирующих сигнальных доменов, полученных из костимулирующей молекулы, такой как, но не ограничиваясь этим, CD28, CD137, CD134 или CD278. В другом варианте осуществления настоящего изобретения Т-тело включает CAR по изобретению, включающий внеклеточный специфичный для мишени связывающий домен, трансмембранный домен, шарнирную или спейсерную область между внеклеточным связывающим доменом и трансмембранным доменом, внутриклеточный сигнальный домен (такой как сигнальный домен, полученный из CD3-дзета или FcR-гамма), и/или один или более костимулирующих сигнальных доменов, полученных из костимулирующей молекулы. Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения Т-тело включает CAR-конструкцию Т-тела, содержащую внеклеточный специфический для мишени домен связывания и константный домен Т-клеточного рецептора. Внеклеточный специфичный для мишени связывающий домен, подходящий для использования в Т-теле, содержащем любой из CAR, описанных в настоящем документе, может включать Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>, Fv или одноцепочечный Fv (scFv) антигенсвязывающего белка по изобретению.

Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткани лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткани тимуса, ткани из участка инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из образца крови, собранной у пациента, с использованием любого ряда методик, известных специалисту, таких как разделение с использованием FICOLL. В одном варианте осуществления клетки из циркулирующей крови индивидуума получают аферезом. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В одном варианте осуществления клетки, собранные с помощью афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующей обработки. В одном варианте осуществления изобретения клетки промывают PBS. В альтернативном варианте промывочный раствор не содержит кальция и может не содержать магния или может не содержать многих, если не все двухвалентные катионы. Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, стадия промывки может быть выполнена способами, известными специалистам в данной области, такими как использование полуавтоматической проточной центрифуги. После промывки клетки могут быть ресуспендированы в различных биосовместимых буферах или другом физиологическом растворе с буфером или без него. В некоторых вариантах осуществления нежелательные компоненты образца афереза могут быть удалены непосредственно в ресуспендированной культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) путем лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, центрифугированием в градиенте PERCOLL. Специфическая субпопуляция Т-клеток, такая как CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-клетки, может быть дополнительно выделена методами положительной или отрицательной селекции. Например, обогащение популяции Т-клеток путем отрицательной селекции может быть достигнуто с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отселектированных клеток. Одним из способов для использования в настоящем описании является сортировка и/или селекция клеток посредством отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которой используется набор моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на отрицательно отселектированных клетках. Например, для обогащения клеток CD4<sup>+</sup> путем отрицательной селекции коктейль моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Проточная цитометрия и сортировка клеток также могут быть использованы для выделения популяций клеток, представляющих интерес для использования в настоящем изобретении.

PBMC могут использоваться непосредственно для генетической модификации с помощью CAR, используя способы, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления после

выделения РВМС дополнительно выделяют Т-лимфоциты, и в некоторых вариантах осуществления цитотоксические и хелперные Т-лимфоциты могут быть отсортированы в субпопуляции наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток либо до, либо после генетической модификации и/или экспансии. CD8+ клетки могут быть получены с использованием стандартных методов. В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки дополнительно сортируются в наивные, клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации антигенов клеточной поверхности, которые связаны с каждым из этих типов CD8+ клеток. В вариантах осуществления Т-клетки памяти присутствуют как в CD62L+, так и в CD62L-субпопуляциях CD8+ лимфоцитов периферической крови. РВМС сортируют по фракциям CD62L-CD8+ и CD62L+ CD8+ после окрашивания антителами против CD8 и против CD62L. В некоторых вариантах осуществления экспрессия фенотипических маркеров центральной памяти TCM включает CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и CD127 и отрицательна для гранзима В. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки центральной памяти представляют собой CD45RO+, CD62L+, CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки являются отрицательными в отношении CD62L, CCR7, CD28 и CD127 и положительными в отношении гранзима В и перфорина. В некоторых вариантах осуществления наивные CD8+ Т-лимфоциты характеризуются экспрессией фенотипических маркеров наивных Т-клеток, включая CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 и CD45RA.

В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки дополнительно сортируют в субпопуляции. Например, CD4+ Т-хелперные клетки могут быть отсортированы в наивные, клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации популяций клеток, которые имеют антигены клеточной поверхности. CD4+ лимфоциты могут быть получены стандартными методами. В некоторых вариантах осуществления наивными CD4+ Т-лимфоцитами являются CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти являются CD62L-положительными и CD45RO-положительными. В некоторых вариантах осуществления эффекторные CD4+ клетки являются отрицательными по CD62L и CD45RO.

Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, могут быть генетически модифицированы после выделения с использованием известных методов, или иммунные эффекторные клетки могут быть активированы и размножены (или дифференцированы в случае предшественников) *in vitro* перед их генетической модификацией. В другом варианте осуществления иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицируют с использованием химерных антигенных рецепторов, описанных в настоящем документе (например, трансдуцированы вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), а затем активируются и размножаются *in vitro*. Способы активации и размножения Т-клеток известны в данной области и описаны, например, в патенте США № 6905874; патенте США № 6867041; патенте США 6797514; WO2012079000, US 2016/0175358. Обычно такие способы включают контактирование РВМС или выделенных Т-клеток со стимулирующим агентом и костимулирующим агентом, таким как антитела против CD3 и против CD28, обычно прикрепленные к микросфере или другой поверхности, в культуральной среде с соответствующими цитокинами, такими как IL-2. Антитела против CD3 и против CD28, прикрепленные к одной и той же микросфере, служат в качестве "суррогатной" антигенпрезентирующей клетки (APC). В других вариантах осуществления Т-клетки могут быть активированы и стимулированы для пролиферации с помощью фидерных клеток и соответствующих антител и цитокинов с использованием способов, таких как те, которые описаны в патенте США № 6040177; патенте США № 5827642; и WO2012129514.

Изобретение относится к популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток для лечения ассоциированного с HPV заболевания или расстройства, например злокачественного новообразования, причем модифицированные иммунные эффекторные клетки включают HLA-A2:HPV16E7 CAR, как описано в настоящем документе.

CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, полученные, как описано в настоящем документе, могут быть использованы в способах и композициях для адоптивной иммунотерапии в соответствии с известными методиками или их вариациями, которые будут очевидны для специалистов в данной области техники на основании настоящего раскрытия; см., например, публикацию заявки на патент США № 2003/0170238, выданную Gruenberg et al; см. также патент США № 4690915 Rosenberg.

В некоторых вариантах осуществления клетки готовят путем сбора их сначала из их культуральной среды, а затем промывают и концентрируют клетки в среде и системе контейнеров, подходящих для введения ("фармацевтически приемлемый" носитель) в эффективном для лечения количестве. Подходящей инфузионной средой может быть изотоническая среда любого состава, обычно нормальный физиологический раствор, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), но также можно использовать 5% декстрозу в воде или лактате Рингера. Инфузионная среда может быть дополнена человеческим сывороточным альбумином.

Эффективное для лечения количество клеток в композиции составляет, по меньшей мере, 2 клетки (например, по меньшей мере, 1 CD8+ Т-клетка центральной памяти и, по меньшей мере, 1 CD4+ хелперная Т-клетка) или более часто больше чем  $10^2$  клеток и до  $10^6$ , до и включая  $10^8$  или  $10^9$  клеток и может быть больше чем  $10^{10}$  клеток. Количество клеток будет зависеть от конечного использования, для которого предназначена композиция, а также от типа клеток, включенных в нее.



Клетки могут быть аутологичными или гетерологичными для пациента, подвергающегося терапии. При желании лечение может также включать введение митогенов (например, РНА) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (например, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-18 и TNF- $\beta$ , GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 $\alpha$  и т.д.), как описано в настоящем документе, для усиления индукции иммунного ответа.

CAR-экспрессирующие популяции иммунных эффекторных клеток по настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как IL-2, или с другими цитокинами или клеточными популяциями. Вкратце, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать CAR-экспрессирующую популяцию иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки, как описано в настоящем документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный буферный солевой раствор, фосфатно-буферный солевой раствор и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстран, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно готовы для внутривенного введения.

Противоопухолевый иммунный ответ, индуцированный у пациента путем введения Т-клеток, экспрессирующих CAR, описанных в настоящем документе, с использованием способов, описанных в настоящем документе, или других способов, известных в данной области, может включать клеточный иммунный ответ, опосредованный цитотоксическими Т-клетками, способными убивать инфицированные клетки, и ответ регуляторных Т-клеток и хелперных Т-клеток. Также могут быть индуцированы гуморальные иммунные ответы, опосредованные главным образом хелперными Т-клетками, способными активировать В-клетки, что приводит к выработке антител. Для анализа типа иммунных ответов, вызванных композициями по настоящему изобретению, могут быть использованы различные методики, которые хорошо описаны в данной области; например, Current Protocols in Immunology, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способам лечения индивидуума, у которого диагностировано или предположительно имеется заболевание или расстройство, ассоциированное с HPV, или есть риск его развития, например HPV16E7-положительного злокачественного новообразования, причем способы включают введение индивидууму терапевтически эффективного количества CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, как описано в настоящем документе.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения пациента, у которого диагностировано HPV16E7-положительное злокачественное новообразование, включающему удаление иммунных эффекторных клеток у пациента, у которого диагностировано HPV16E7-положительное злокачественное новообразование, генетическую модификацию указанных иммунных эффекторных клеток вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению, таким образом продуцируя популяцию модифицированных иммунных эффекторных клеток, и введение популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток тому же самому пациенту. В одном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки содержат Т-клетки.

Способы введения клеточных композиций, описанных в настоящем документе, включают любой способ, который эффективен для того, чтобы привести к реинтродукции *ex vivo* генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые либо непосредственно экспрессируют CAR по изобретению у пациента, либо к реинтродукции генетически модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток, которые при введении пациенту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, которые экспрессируют CAR. Один способ включает трансдукцию Т-клеток периферической крови *ex vivo* с помощью конструкции нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением и возврат трансдуцированных клеток пациенту.

Терапевтическое введение и составы.

Изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7, например антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или CAR по настоящему изобретению. Терапевтические композиции в соответствии с изобретением будут вводиться с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые включены в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и тому подобного. Множество подходящих составов можно найти в пособиях, известных всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липидсодержащие (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN<sup>TM</sup>), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс; см. также Powell et al. "Compendium of excipients for

parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антигенсвязывающего белка, например антитела или его антигенсвязывающих фрагментов, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, которому необходимо введение, целевого заболевания, условий, пути введения и тому подобного. Когда антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению используется для лечения заболевания или расстройства у взрослого пациента или для предотвращения такого заболевания, выгодно вводить антигенсвязывающий белок, например антитело или его антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, обычно в однократной дозе от примерно 0,1 до примерно 60 мг/кг массы тела, более предпочтительно от примерно 5 до примерно 60, от примерно 20 до примерно 50, от примерно 10 до примерно 50, от примерно 1 до примерно 10 или от примерно 0,8 до примерно 11 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния, частота и продолжительность лечения могут быть скорректированы. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, например, антитело или его антигенсвязывающие фрагменты по изобретению можно вводить в виде начальной дозы, по меньшей мере, от примерно 0,1 мг до примерно 800 мг, от примерно 1 до примерно 500 мг, от примерно 5 до примерно 300 мг или от примерно 10 до примерно 200 мг, до примерно 100 мг или до примерно 50 мг. В некоторых вариантах осуществления начальная доза может сопровождаться введением второй или множества последующих доз антигенсвязывающего белка, например, антитела или его антигенсвязывающих фрагментов в количестве, которое может быть приблизительно таким же или меньшим чем начальная доза, при этом последующие дозы разделены между собой, по меньшей мере, от 1 дня до 3 дней; по меньшей мере одной неделей, по меньшей мере 2 неделями; по меньшей мере 3 неделями; по меньшей мере 4 неделями; по меньшей мере 5 неделями; по меньшей мере 6 неделями; по меньшей мере 7 неделями; по меньшей мере 8 неделями; по меньшей мере 9 неделями; по меньшей мере 10 неделями; по меньшей мере 12 неделями; или по меньшей мере 14 неделями.

Известны различные системы доставки, и их можно использовать для введения фармацевтической композиции по изобретению, например, для инкапсуляции в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Способы введения включают, но не ограничиваются ими, внутрикожный, трансдермальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальную или слизистую оболочку (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным. Фармацевтическая композиция также может быть доставлена в везикуле, в частности в липосоме (см., например, Langer (1990) Science 249: 1527-1533).

Использование наночастиц для доставки антигенсвязывающих белков, например, антител или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению также рассматривается в настоящем документе. Антигенсвязывающие белковые конъюгированные наночастицы могут быть использованы как для терапевтического, так и для диагностического применения. Антигенсвязывающие белковые конъюгированные наночастицы и способы их приготовления и применения подробно описаны Arruebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" в J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Наночастицы могут быть разработаны и конъюгированы с антигенсвязывающими белками, содержащимися в фармацевтических композициях, для нацеливания на опухолевые клетки или на аутоиммунные клетки ткани или клетки, инфицированные вирусом. Наночастицы для доставки лекарственных средств также были описаны, например, в патенте США № 8 257 740 или патенте США № 8246995, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых ситуациях фармацевтическая композиция может доставляться в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления может использоваться помпа. В другом варианте могут быть использованы полимерные материалы. Еще в одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, в результате чего требуется только доля от системной дозы.

Препараты для инъекций могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных, внутривенных, внутрибрюшинных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть получены общеизвестными способами. Например, препараты для инъекций могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антигенсвязывающего белка или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций имеются, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солибилизирующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (поли-

оксиэтилен (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используются, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученную таким образом инъекцию предпочтительно заполняют в соответствующую ампулу.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может доставляться подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, устройство для доставки в виде шприца-ручки легко находит применение при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такое устройство доставки как шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки в виде шприца-ручки обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция в картридже введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство доставки в виде шприца-ручки затем может быть повторно использовано. В одноразовом устройстве доставки в виде шприца-ручки нет сменного картриджа. Скорее, одноразовое устройство для доставки шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опорожняется от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

Многочисленные многоразовые устройства доставки в виде шприца-ручки и автоинжектора находят применение в подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Примеры включают, но не ограничиваются ими, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручка DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручка HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручка HUMALOG™, HUMALIN 70/30™ шприц-ручка (Eli Lilly и Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Ново Нордиск, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Ново Нордиск, Копенгаген, Дания), шприц-ручка BD™ (Бектон Дикинсон, Франклин Лейке, Нью-Джерси, ОРТИПЕН™, ОРТИПЕН PRO™, ОРТИПЕН STARLET™ и ОРТИКЛИК™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия) - это лишь некоторые из них. Примеры одноразовых устройств для доставки в виде шприца-ручки, имеющих применение при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются этим, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Deu, LP) и ручка HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), - это лишь некоторые из них.

Преимущественно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде лекарственных форм в единичной дозе, подходящей для дозы активного ингредиента. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антигенсвязывающего белка обычно составляет от примерно 5 до примерно 500 мг на лекарственную форму в единице дозы; особенно в форме инъекций, предпочтительно, чтобы антигенсвязывающий белок содержался в количестве от примерно 5 до примерно 100 мг и от примерно 10 до примерно 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические применения антигенсвязывающих белков.

Антитела по изобретению полезны, среди прочего, для лечения, предотвращения и/или улучшения любого заболевания или расстройства, ассоциированного или опосредованного HPV16. Например, настоящее изобретение относится к способам лечения HPV-ассоциированного заболевания или расстройства, такого как HPV-ассоциированное злокачественное новообразование (например, HPV16E7-положительное злокачественное новообразование) (ингибирование роста опухоли) и/или HPV-инфекций, путем введения антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 (или фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7), как описано в настоящем документе, для пациента, нуждающегося в таком лечении, и к антигенсвязывающим белкам против HLA-A2:HPV16E7 (или фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7) для применения при лечении ассоциированного с HPV злокачественного новообразования (ингибирование роста опухоли) и/или инфекций HPV. Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению полезны для лечения, предотвращения и/или нейтрализации заболевания или расстройства или состояния, такого как злокачественное новообразование, ассоциированное с HPV, или инфекции HPV, и/или для нейтрализации по меньшей мере одного симптома, связанного с таким заболеванием, расстройством или состоянием. В контексте способов лечения, описанных в настоящем документе, антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7 можно вводить в виде монотерапии (т.е. в качестве единственного терапевтического агента) или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами (примеры которых описаны в другом месте настоящего описания).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, описанные в настоящем документе, полезны для лечения пациентов, имеющих первичное или рецидивирующее злокачественное новообразование, включая, но не ограничиваясь этим, злокачественное новообразование, ассоциированное с HPV, например плоскоклеточный рак, такой как плоскоклеточный рак головы и шеи, рак шейки матки, рак

аногенитальной области, рак ротоглотки.

Антигенсвязывающие белки могут быть использованы для лечения ранней или поздней стадии симптомов злокачественного новообразования, ассоциированного с HPV. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент по изобретению можно использовать для лечения прогрессирующего или метастатического злокачественного новообразования. Антигенсвязывающие белки полезны для уменьшения или ингибирования или сокращения роста опухоли. В некоторых вариантах осуществления лечение с использованием антигенсвязывающего белка по изобретению приводит к регрессии более чем 40%, регрессии более чем 50%, регрессии более чем 60%, регрессии более чем 70%, регрессии более чем 80% или регрессии более чем 90% опухоли у пациента. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки могут быть использованы для предотвращения рецидива опухоли. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки полезны для увеличения выживаемости без прогрессирования или общей выживаемости у пациента со злокачественным новообразованием, ассоциированным с HPV. В некоторых вариантах осуществления антитела полезны для снижения токсичности вследствие химиотерапии или лучевой терапии при поддержании долгосрочной выживаемости у пациента, имеющего злокачественное новообразование, ассоциированное с HPV.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по изобретению полезны для лечения пациентов, страдающих хронической инфекцией HPV. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по изобретению полезны для снижения вирусных титров у хозяина.

Одно или более антител по настоящему изобретению можно вводить для облегчения или предотвращения или уменьшения тяжести одного или более симптомов или состояний заболевания или расстройства.

В настоящем описании также предполагается профилактическое использование одного или более антител по настоящему изобретению для пациентов с риском развития заболевания или расстройства, такого как ассоциированное с HPV заболевание или расстройство, такое как злокачественное новообразование, ассоциированное с HPV, и инфекция HPV.

В дополнительном варианте осуществления изобретения настоящие антитела используются для приготовления фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от HPV-ассоциированного заболевания или расстройства, такого как HPV-ассоциированное злокачественное новообразование или HPV-инфекция. В другом варианте осуществления изобретения антитела по настоящему изобретению используются в качестве дополнительной терапии любым другим агентом или любой другой терапией, известной специалистам в данной области, полезной для лечения злокачественного новообразования, ассоциированного с HPV, или инфекции HPV.

Комбинированная терапия и составы.

Комбинированная терапия может включать антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению, такой как CAR по изобретению (например, иммунная эффекторная клетка, содержащая CAR по изобретению) или фармацевтическую композицию по изобретению, и любой дополнительный терапевтический агент, который может быть выгодно объединен с антигенсвязывающим белком по изобретению. Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут быть синергически объединены с одним или более противоопухолевыми лекарственными средствами или терапией, используемой для лечения или ингибирования ассоциированного с HPV16E7 заболевания или расстройства, такого как HPV-положительное злокачественное новообразование, например плоскоклеточный рак, шейный отдел рак, аногенитальный рак, рак головы и шеи или рак ротоглотки.

В настоящем описании предполагается использовать антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению в комбинации с иммуностимулирующей и/или иммуносупрессивной терапией для ингибирования роста опухоли и/или повышения выживаемости онкологических пациентов. Иммуностимулирующая терапия включает прямую иммуностимулирующую терапию для увеличения активности иммунных клеток путем "отпускания тормоза" на подавленных иммунных клетках или "наступления на газ" для активации иммунного ответа. Примеры включают нацеливание на другие ключевые рецепторы, вакцинацию и адъюванты. Иммуноподдерживающие условия могут увеличивать антигенность опухоли, способствуя гибели иммуногенных клеток, воспалению или иметь другие косвенные эффекты, которые стимулируют противоопухолевый иммунный ответ. Примеры включают облучение, химиотерапию, антиангиогенные средства и хирургическое вмешательство.

В различных вариантах осуществления один или более антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с ингибитором PD-1 (например, антителом против PD-1, таким как ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, BGB-A317 или REGN2810), ингибитором PD-L1 (например, антителом против PD-L1, таким как авелумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, MDX-1105 или REGN3504), ингибитором CTLA-4 (например, ипилимумаб), ингибитором TIM3, ингибитором BTLA, ингибитором TIGIT, ингибитором CD47, ингибитором GITR, антагонистом другого ко-ингибитора T-клеток или лиганда (например, антитело к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонистом сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) [например, "VEGF-Trap", такой как афлиберцепт или другой VEGF-ингибирующий слитый белок, как указано в US 7087411, или антитело против VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент (на-

пример, бевацизумаб или ранибизумаб) или низкомолекулярный киназный ингибитор рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)], ингибитором Ang2 (например, несвакумаб), ингибитором трансформирующего фактора роста бета (TGFP), ингибитором рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотиниб, цетуксимаб), ингибитором CD20 (например, антитело против CD20, такое как ритуксимаб), антителом к опухолеспецифическому антигену [например, CA9, CA125, меланома-ассоциированный антиген 3 (MAGE3), карциноэмбриональный антиген (CEA), виментин, опухоль-M2-РК, простатоспецифичный антиген (PSA), муцин-1, MART-1 и CA19-9], вакциной (например, Bacillus Calmette-Guerin, противоопухолевая вакцина), адьювантом для повышения презентирования антигена (например, гранулоцит-макрофаг-колониестимулирующий фактор), биспецифическим антителом (например, CD3xCD20 биспецифическое антитело или PSMAXCD3 биспецифическое антитело), цитотоксином, химиотерапевтическим средством (например, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубин, даунорубин, цисплатин, карбоплатин, гемцитабин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел и винкристин), циклофосфамидом, лучевой терапией, ингибитором IL-6R (например, сарилумаб), ингибитором IL-4R (например, дупилумаб), ингибитором IL-10, цитокин, такой как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC) (например, ADC против CD19-DM4 и ADC против DS6-DM4), противовоспалительным лекарственным средством (например, кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), пищевой добавкой, такой как антиоксиданты, или с любой другой терапией для лечения злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с вакциной против HPV. Типичные вакцины против HPV включают Gardasil, Gardasil 9 и Cervarix, Lm-LLo-E7 (ADXS11-001; ADXS-HPV; Advaxis, Inc.); GLBLI0lc (GENOLAC BL Corp.); TA-HPV (Европейская организация по исследованию и лечению рака (EORTC)); TG4001 (Transgene/Roche); MVA E2 (Institute Mexicano del Seguro Social); HPV16-SLP (ISA Pharmaceuticals); GL-0810 (Gliknik Inc.); Pepsan+Candin (Университет Арканзаса); GTL001 (ProCervix; Genticel); TA-CIN (Xenova Research Limited); TA-CIN+TA-HPV (Celtic Pharma); pNGVL4a-sig/E7 (детокс)/H8P70+TA-HPV (Комплексный онкологический центр Сидни Киммела); pNGVL4a-CRT/E7 (детокс) (Комплексный онкологический центр Сидни Киммела); GX-188E (Genexine, Inc.); VGX-3100 (Inovio Pharmaceuticals); Дендритные клетки, стимулированные HPV-16 и HPV-18 E7 и гемоцианином лимфы улитки (Национальные институты здоровья); DC, стимулированные HPV+опухолевый лизат (Департамент биотехнологии (DBT, Govt. Индии)); PDS0101 (PDS Biotechnology Corp.); ProCervix (Genticel); GX-188E (Genexine, Inc.); pNGVL4a-CRT/E7 (детокс) (Комплексный онкологический центр Сидни Киммела); pNGVL4a-sig/E7 (детокс)/HSP70+TA-HPV (Комплексный онкологический центр Сидни Киммела); TVGV-1+GPI-0100 (THEVAX Genetics Vaccine Co.); Pepsan+Candin (Университет Арканзаса); ISA101 (SLP-HPV-01; HPV16-SLP; ISA Pharmaceuticals); ADXS 11-001 (Lm-LLo-E7; Advaxis, Inc.); ISA101 (SLP-HPV-01; HPV16-SLP; ISA Pharmaceuticals); DPX-E7 (Институт рака Дана-Фарбер); ADXS11-001 (Lm-LLo-E7; Advaxis, Inc.); INO-3112 (VGX-3100+INO-9012; Inovio Pharmaceuticals); ADXS 11-001 (Lm-LLo-E7; Advaxis, Inc.); INO-3112 (VGX-3100+INO-9012; Inovio Pharmaceuticals); ISA101 (SLP-HPV-01; HPV16-SLP; ISA Pharmaceuticals); и TA-CIN+GPI-0100 (Комплексный онкологический центр Сидни Киммела). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с противоопухолевыми вакцинами, включая вакцины с дендритными клетками, онколитические вирусы, противоопухолевые вакцины и т.д., для усиления противоопухолевого ответа. Примеры противоопухолевых вакцин, которые можно использовать в комбинации с антигенсвязывающими белками против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению, включают вакцину MAGE3 для лечения меланомы и рака мочевого пузыря, вакцину MUC1 для рака молочной железы, EGFRv3 (например, Rindoperimut) для рака головного мозга (включая мультиформную глиобластому) или ALVAC-CEA (для CEA+ злокачественных новообразований).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению можно вводить в комбинации с лучевой терапией способами, чтобы генерировать долговременные противоопухолевые ответы и/или повышать выживаемость онкологических пациентов. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению можно вводить до, одновременно или после введения лучевой терапии онкологическому пациенту. Например, лучевую терапию можно вводить в одной или более дозах в опухолевые очаги с последующим введением одной или более доз антигенсвязывающих белков против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления лучевая терапия может быть введена локально в опухолевые очаги для усиления локальной иммуногенности опухоли пациента (адьювантная лучевая терапия) и/или для уничтожения опухолевых клеток (аблятивное излучение) с последующим системным введением антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению. Например, внутрочерепное облучение можно проводить пациенту с раком головного мозга (например, мультиформной глиобластомой) в комбинации с системным введением антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению можно вводить в комбинации с лучевой терапией и химиотерапевтическим средством (например, темозоломидом) или антагонистом VEGF (например, афлиберцептом).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению можно вводить в комбинации с одним или более противовирусными лекарственными средствами для лечения хронической инфекции HPV. Примеры противовирусных лекарственных средств включают, но не ограничиваются ими, зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренц, кобицистат, тенофовир, рилпивирин и кортикостероиды.

Дополнительный терапевтически активный агент (агенты)/компонент (компоненты) можно вводить до, одновременно или после введения антигенсвязывающих белков против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению. Для целей настоящего изобретения такие схемы введения рассматриваются как введение антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 "в комбинации с" вторым терапевтически активным компонентом.

Дополнительный терапевтически активный компонент (компоненты) можно вводить пациенту до введения антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным "до" второго компонента, если первый компонент вводится за 1 неделю, за 72 часа, за 60 часов, за 48 часов, за 36 часов, за 24 часа, за 12 часов, за 6 часов, за 5 часов, за 4 часа, за 3 часа, за 2 часа, за 1 час, за 30 минут, за 15 минут, за 10 минут, за 5 минут или менее чем за 1 минуту до введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный терапевтически активный компонент (компоненты) можно вводить пациенту после введения антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным "после" второго компонента, если первый компонент вводится через 1 минуту, через 5 минут, через 10 минут, через 15 минут, через 30 минут, через 1 час после, через 2 часа после, через 3 часа, через 4 часа, через 5 часов, через 6 часов, через 12 часов, через 24 часа, через 36 часов, через 48 часов, через 60 часов, через 72 часа после введения второго компонента. В еще других вариантах осуществления дополнительный терапевтически активный компонент (компоненты) можно вводить пациенту одновременно с введением антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению. "Одновременное" введение для целей настоящего изобретения включает, например, введение антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 и дополнительного терапевтически активного компонента пациенту в виде одной лекарственной формы (например, совместно приготовленной формы) или в отдельных лекарственных формах, вводимых пациенту в течение примерно 30 минут или менее относительно друг друга. При введении в отдельных лекарственных формах каждую лекарственную форму можно вводить одним и тем же путем (например, антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7 и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно, подкожно и т.д.); альтернативно, каждую лекарственную форму можно вводить другим путем (например, антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7 можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить подкожно). В любом случае введение компонентов в одной лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах одним и тем же путем или в отдельных лекарственных формах разными путями, все считается "одновременным введением" для целей настоящего раскрытия. Для целей настоящего изобретения введение антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 "до", "одновременно с" или "после" (как эти термины определены выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считается введением антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом).

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению готовят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими компонентами (компонентами), как описано в других местах настоящего документа, с использованием различных комбинаций дозировок.

Схемы введения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения многократные дозы антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 и любого из дополнительных терапевтически активных агентов, упомянутых в настоящем описании), можно вводить пациенту в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение пациенту многократных доз антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению. Используемый в настоящем описании термин "последовательное введение" означает, что каждая доза антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 вводится пациенту в другой момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7, после чего следует одна или более вторичных доз антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 и необязательно с последующей одной или более третичными дозами антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7. Антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7 можно вводить в дозе от 0,1 до 100 мг/кг массы тела пациента.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последо-

вательности введения антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемой "базовой дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы все могут содержать одинаковое количество антиген связывающего белка против HLA-A2:HPV16E7, но, как правило, могут отличаться друг от друга по частоте введения. В некоторых вариантах осуществления количество антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7, содержащееся в начальной, вторичной и/или в третичной дозе варьируется друг от друга (например, повышается или понижается по необходимости) в процессе лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале схемы лечения в виде "нагрузочных доз" с последующими дозами, которые вводят реже (например, "поддерживающие дозы").

В некоторых вариантах осуществления количество антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, может быть субоптимальным или субтерапевтическим. Используемые в настоящем описании термины "субтерапевтический" или "субоптимальный" относятся к дозе антигена, вводимой на слишком низком уровне, чтобы вызвать терапевтический эффект, или ниже уровня, необходимого для лечения заболевания, такого как злокачественное новообразование.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 недель (например, через 1, 1<sup>1/2</sup>, 2, 2<sup>1/2</sup>, 3, 3<sup>1/2</sup>, 4, 4<sup>1/2</sup>, 5, 5<sup>1/2</sup>, 6, 6<sup>1/2</sup>, 7, 7<sup>1/2</sup>, 8, 8<sup>1/2</sup>, 9, 9<sup>1/2</sup>, 10, 10<sup>1/2</sup>, 11, 11<sup>1/2</sup>, 12, 12<sup>1/2</sup>, 13, 13<sup>1/2</sup>, 14, 14<sup>1/2</sup>, 15, 15<sup>1/2</sup>, 16, 16<sup>1/2</sup>, 17, 17<sup>1/2</sup>, 18, 18<sup>1/2</sup>, 19, 19<sup>1/2</sup>, 20, 20<sup>1/2</sup>, 21, 21<sup>1/2</sup>, 22, 22<sup>1/2</sup>, 23, 23<sup>1/2</sup>, 24, 24<sup>1/2</sup>, 25, 25<sup>1/2</sup>, 26, 26<sup>1/2</sup> или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Выражение "непосредственно предшествующая доза", используемое в настоящем описании, означает, в последовательности многократных введений, дозу антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7, которую вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы согласно этому аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающего белка против HLA-A2:HPV16E7. Например, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах осуществления, включающих множество вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту через 1-2 недели или через 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих множественные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения может также регулироваться врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

Диагностическое использование антигенсвязывающих белков.

Антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7 по настоящему изобретению можно использовать для детектирования и/или измерения HPV16E7 в образце, например, для диагностических целей. Некоторые варианты осуществления предусматривают использование одного или более антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению в анализах для выявления заболевания или расстройства, такого как заболевание или расстройство, ассоциированное с HPV, такое как HPV16E7-положительное злокачественное новообразование или инфекция HPV. Типичные диагностические анализы для HPV16E7 могут включать, например, контактирование образца, полученного от индивидуума (например, пациента), с антигенсвязывающим белком против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению, где антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7 метят детектируемой меткой или репортерной молекулой или используют в качестве захватывающего лиганда для селективного выделения HPV16E7 из исследуемых образцов. Альтернативно, немеченый антигенсвязывающий белок против HLA-A2:HPV16E7 можно использовать в диагностических целях в комбинации со вторичным антигенсвязывающим белком, например антителом, которое само детектируемо мечено. Детектируемая метка или репортерная молекула может быть радиоизотопом, таким как <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S или <sup>125</sup>I; флуоресцентным или хемилюминесцентным фрагментом, таким как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или ферментом, таким как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные типовые анализы, которые можно использовать для детектирования или измерения HPV16E7 в образце, включают иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (RIA) и флуоресцентно-активированную сортировку клеток (FACS).

Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах HPV16E7 в соответствии с настоящим изобретением, включают любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, содержащий детектируемые количества белка HPV16E7 или его фрагментов в нормальных или патологических условиях. Как правило, уровни HPV16E7 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не имеющего заболевания или расстройства, ассоциированного с HPV16E7, например, HPV16E7-положительного злокачественного новообразования), будут измеряться для первоначального установления базового или стандартного уровня HPV16E7. Этот базовый уровень HPV16E7 затем можно сравнить с уровнями HPV16E7, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие заболевания, связанного со злокачественным новообразованием, или симптомов, связанных с таким состоянием.

Антигенсвязывающие белки, специфичные для HPV16E7, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном варианте осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания локализация метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан этот пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевую биотин, будет ориентирован так, что C-концевая часть пептида будет дистальной к поверхности.

Аспекты изобретения относятся к использованию раскрытых антигенсвязывающих белков в качестве маркеров для представления прогноза HPV16E7-положительного злокачественного новообразования или инфекции HPV у пациентов. Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению можно использовать в диагностических анализах для оценки прогноза злокачественного новообразования у пациента и для прогнозирования выживаемости.

### Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области полное раскрытие и описание способов изготовления и применения изобретения, и не предназначены для ограничения объема того, что рассматривают изобретатели в качестве своего изобретения. Были предприняты усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количествам, температуре и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет примерно 25°C, а давление составляет или близко к атмосферному.

Пример 1. Получение человеческих антител к HLA-A2:HPV16E7.

Человеческие антитела к HLA-A2:HPV16E7 были получены с использованием пептидных фрагментов HPV16E7, которые включают в себя либо аминокислоты 11-19 (YMLDLQPET; SEQ ID NO: 538) из GenBank номер доступа NP\_041326.1 (SEQ ID NO: 537), либо аминокислотные остатки 82-90 (LLMGTLGIV; SEQ ID NO: 539) GenBank NP\_041326.1 (SEQ ID NO: 537), соединенные с HLA-A2. Иммуноген вводили непосредственно, с адьювантом для стимуляции иммунного ответа мыши VELOCIMUNE® (то есть сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи каппа человеческого иммуноглобулина), например, как описано в Патенте США № 8502018. Иммунный ответ антител контролировали с помощью HLA-A2:HPV16E7-специфического иммуноанализа. Когда был достигнут желаемый иммунный ответ, спленоциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши, чтобы сохранить их жизнеспособность и сформировать гибридные клеточные линии. Гибридные клеточные линии подвергали скринингу и отбирали для идентификации клеточных линий, которые продуцируют HLA-A2:HPV16E7-специфические антитела. Используя эту методику и иммуноген, описанный выше, было получено несколько химерных антител против HPV16E7 (т.е. антител, обладающих переменными доменами человека и константными доменами мыши). Иллюстративные антитела, полученные таким образом, были обозначены следующим образом: H4sH17364N; H4sH17368N2; H4sH17930N; H4sH17930N2; H4sH17363N и H4sH17368N3.

Антитела против HLA-A2:HPV16E7 также выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток (от любой из иммунизированных мышей) без слияния с клетками миеломы, как описано в Патенте США 7582298, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Используя этот способ, было получено несколько полностью человеческих антител против HLA-A2:HPV16E7 (т.е. антител, обладающих переменными доменами человека и константными доменами человека).

Иллюстративные антитела, полученные в соответствии с вышеуказанными способами, были обозначены следующим образом: H4sH17670P; H4sH17672P; H4sH17673P; H4sH17675P; H4sH17680P; H4sH17697P; H4sH17707P; H4sH17715P; H4sH17726P; H4sH17730P; H4sH21051P; H4sH21054P; H4sH21055P; H4sH21058P; H4sH21064P; H4sH21073P; H4sH21077P; H4sH21079P; H4sH21080P; H4sH21083P; H4sH21086P; H4sH21090P; H4sH21091P; H4sH21093P; H4sH21099P; H4sH21100P; H4sH21103P; и H4sH21104P.

Биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами этого



Примера, подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

Пример 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей варибельных областей тяжелой и легкой цепей и CDR отобранных антител против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в табл. 2.

Таблица 1

Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LC DR 3
H4sH17364N	2	4	6	8	10	12	14	16
H4sH17368N2	18	20	22	24	26	28	30	32
H4sH17670P	34	36	38	40	42	44	46	48
H4sH17672P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4sH17673P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4sH17675P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4sH17680P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4sH17697P	114	116	118	120	122	124	126	128
H4sH17707P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4sH17715P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4sH17726P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4sH17730P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4sH17930N	210	212	214	216	202	204	206	208
H4sH17930N2	194	196	198	200	202	204	206	208
H4sH21051P	218	220	222	224	226	228	230	232
H4sH21054P	234	236	238	240	242	244	246	248
H4sH21055P	250	252	254	256	258	260	262	264
H4sH21058P	266	268	270	272	274	276	278	280
H4sH21064P	282	284	286	288	290	292	294	296
H4sH21073P	298	300	302	304	306	308	310	312
H4sH21077P	314	316	318	320	322	324	326	328
H4sH21079P	330	332	334	336	338	340	342	344
H4sH21080P	346	348	350	352	354	356	358	360
H4sH21083P	362	364	366	368	370	372	374	376
H4sH21086P	378	380	382	384	386	388	390	392
H4sH21090P	394	396	398	400	402	404	406	408
H4sH21091P	410	412	414	416	418	420	422	424
H4sH21093P	426	428	430	432	434	436	438	440
H4sH21099P	442	444	446	448	450	452	454	456
H4sH21100P	458	460	462	464	466	468	470	472
H4sH21103P	474	476	478	480	482	484	486	488
H4sH21104P	490	492	494	496	498	500	502	504
H4sH17363N	506	508	510	512	514	516	518	520
H4sH17368N3	522	524	526	528	530	532	534	536

Таблица 2

## Идентификаторы последовательности нуклеиновых кислот

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR1	HCDR 2	HCDR3	LCVR	LCDR 1	LCDR2	LCD R3
H4sH17364N	1	3	5	7	9	11	13	15
H4sH17368N 2	17	19	21	23	25	27	29	31
H4sH17670P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4sH17672P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4sH17673P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4sH17675P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4sH17680P	97	99	101	103	105	107	109	111
H4sH17697P	113	115	117	119	121	123	125	127
H4sH17707P	129	131	133	135	137	139	141	143
H4sH17715P	145	147	149	151	153	155	157	159
H4sH17726P	161	163	165	167	169	171	173	175
H4sH17730P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4sH17930N	209	211	213	215	201	203	205	207
H4sH17930N 2	193	195	197	199	201	203	205	207
H4sH21051P	217	219	221	223	225	227	229	231
H4sH21054P	233	235	237	239	241	243	245	247
H4sH21055P	249	251	253	255	257	259	261	263
H4sH21058P	265	267	269	271	273	275	277	279
H4sH21064P	281	283	285	287	289	291	293	295
H4sH21073P	297	299	301	303	305	307	309	311
H4sH21077P	313	315	317	319	321	323	325	327
H4sH21079P	329	331	333	335	337	339	341	343
H4sH21080P	345	347	349	351	353	355	357	359
H4sH21083P	361	363	365	367	369	371	373	375
H4sH21086P	377	379	381	383	385	387	389	391
H4sH21090P	393	395	397	399	401	403	405	407
H4sH21091P	409	411	413	415	417	419	421	423
H4sH21093P	425	427	429	431	433	435	437	439
H4sH21099P	441	443	445	447	449	451	453	455
H4sH21100P	457	459	461	463	465	467	469	471
H4sH21103P	473	475	477	479	481	483	485	487
H4sH21104P	489	491	493	495	497	499	501	503
H4sH17363N	505	507	509	511	513	515	517	519
H4sH17368N 3	521	523	525	527	529	531	533	535

Антитела обычно упоминаются в настоящем описании в соответствии со следующей номенклатурой: префикс Fc (например, "H1M", "H4sH", "H4H" и т.д.), за которым следует числовой идентификатор (например, "17670", "17930" и т.д., как показано в табл. 1), за которым следует суффикс "P", "N" или "N2". Таким образом, в соответствии с этой номенклатурой антитело может упоминаться в настоящем описании, например, как "H4sH17670P", "H4sH17930N", "H4sH17368N2" и т.д. Префиксы H4sH и H4H в обозначениях антител, используемых в настоящем описании, указывают конкретный изотип Fc-области антитела. Например, антитело "H4sH" имеет человеческий Fc IgG4 с 2 или более аминокислотными заменами, как описано в Публикации патента США № 20140243504 (включена в настоящее описание в полном объеме), антитело "H4H" имеет Fc человеческого IgG4 с мутацией серина в пролин в шарнирной области (S108P), антитело "H1M" имеет Fc мышинового IgG1 и "H2M" антитело имеет Fc мышинового IgG2 (все переменные области полностью человеческие, что обозначено первым "H" в обозначении антитела). Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть превращено в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc мышинового IgG1 может быть превращено в антитело с Fc человеческого IgG4 и т.д.), но в любом случае переменные домены (вклю-

чая CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в табл. 1, останутся прежними, и ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или существенно похожи, независимо от природы Fc-домена.

В некоторых вариантах осуществления выбранные антитела с Fc мышиного IgG1 были преобразованы в антитела с Fc человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc человеческого IgG4 с 2 или более аминокислотными заменами, как описано в Патентной публикации США № 20100331527 (включена в настоящее описание в полном объеме). В одном варианте осуществления Fc-домен IgG4 содержит мутацию серина в пролин в шарнирной области (S108P), чтобы способствовать стабилизации димера.

В табл. 3 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности последовательностей тяжелой и легкой цепей отобранных антител по изобретению.

Таблица 3

Идентификаторы последовательности тяжелой цепи и легкой цепи

Обозначение антитела	SEQ ID NO:	
	Тяжелая цепь	Легкая цепь
H4sH17363N	578	579
H4sH17364N	580	581
H4sH17670P	582	583
H4sH17675P	584	585
H4sH17930N2	586	587
H4sH21058P	588	589
H4sH21064P	590	591
H4sH21104P	592	593

Пример 3. Анализ предпочтения варибельного гена.

Для анализа структуры полученных антител клонировали и секвенировали нуклеиновые кислоты, кодирующие варибельные области антител. Из последовательности нуклеиновой кислоты и предсказанной аминокислотной последовательности антител было идентифицировано предпочтение гена для каждой варибельной области тяжелой цепи (HCVR) и варибельной области легкой цепи (LCVR) (табл. 4).

Таблица 4

Обозначение антитела	HCVR (HPV)			LCVR (HPV)	
	VH	DH	JH	VH	JH
H4sH17363N	V3-23	D6-6	J6	V1-39	J5
H4sH17364N	V3-23	D6-6	J6	V1-39	J5
H4sH17368N2	V3-23	D3-9	J4	V1-39	J5
H4sH17368N3	V3-23	D3-9	J4	V1-39	J5
H4sH17670P	V3-64	D1-26	J6	V1-39	J5
H4sH17672P	V3-64	D1-26	J6	V1-39	J5
H4sH17673P	V3-23	D4-11	J6	V1-39	J5
H4sH17675P	V3-64	D1-26	J6	V1-39	J5
H4sH17680P	V3-23	D4-23	J6	V1-39	J5
H4sH17697P	V3-11	D6-13	J4	V1-39	J2
H4sH17707P	V3-23	D1-20	J4	V1-39	J5
H4sH17715P	V6-1	D1-7	J3	V1-39	J2
H4sH17726P	V1-18	D1-7	J4	V3-15	J4
H4sH17730P	V3-11	D1-7	J4	V1-17	J2

H4sH17930N	V3-64	D2-2	J6	V1-39	J5
H4sH17930N2	V3-64	D2-2	J6	V1-39	J5
H4sH21051P	V3-23	D7-27	J4	V1-39	J5
H4sH21054P	V3-23	D1-7	J4	V1-39	J5
H4sH21055P	V3-11	D7-27	J2	V1-39	J2
H4sH21058P	V3-20	D2-2	J5	V1-39	J2
H4sH21064P	V3-64	D6-6	J6	V1-39	J5
H4sH21073P	V3-43	D6-19	J3	V1-39	J2
H4sH21077P	V3-23	D6-19	J3	V1-39	J2
H4sH21079P	V3-15	D1-7	J4	V1-39	J2
H4sH21080P	V3-23	D1-7	J6	V2-28	J1
H4sH21083P	V3-23	D1-7	J2	V3-15	J5
H4sH21086P	V3-33	D2-21	J6	V4-1	J5
H4sH21090P	V3-23	D1-20	J4	V3-15	J4
H4sH21091P	V3-15	D6-19	J6	V1-17	J4
H4sH21093P	V3-33	D3-3	J3	V1-6	J2
H4sH21099P	V3-9	D1-1	J6	V1-39	J5
H4sH21100P	V3-9	D1-7	J3	V1-39	J5
H4sH21103P	V3-15	D1-7	J4	V1-39	J5
H4sH21104P	V3-11	D3-10	J3	V1-39	J5

Пример 4. Аффинность связывания на основе поверхностного плазмонного резонанса и кинетические константы человеческих моноклональных моноспецифических антител против HLA-A2:HPV16E7.

Аффинность связывания и кинетические константы человеческих антител против HLA-A2/HPV16E7 определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени (SPR; Biacore 4000 или Biacore T-200, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) при 25°C. Антитела захватывали на сенсорной поверхности CM5 Biacore (GE Healthcare Life Sciences), дериватизированной путем аминоконденсации с моноклональным антителом против человеческого Fc (GE, # BR-1008-39). Различные концентрации мономерного пептидного комплекса HLA-A2:HPV16E7, содержащего либо пептид E7: 11-19 (SEQ ID NO: 538), либо пептид E7: 82-90 (SEQ ID NO: 539), вводили поверх антитела против HLA-A2: HPV16E7 со скоростью потока 50 мкл/мин (Biacore T-200) или 30 мкл/мин (Biacore 4000). Ассоциацию реагент-антитело контролировали в течение 4-5 мин. и диссоциацию контролировали в течение 10 мин. Все исследования связывания проводили в буфере HBS-ET (0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 0,05% об./об. ПАВ P20).

Константы скорости кинетической ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем подбора сенсограмм в реальном времени к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для подбора кривой Scrubber 2.0с. Константы равновесия диссоциации связывания ( $K_D$ ) и полупериоды диссоциации ( $t^{1/2}$ ) рассчитывали из констант кинетической скорости как

$$K_D \text{ (M)} = \frac{k_d}{k_a}$$

и

$$t^{1/2} \text{ (МИН)} = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

Кинетические параметры связывания для моноспецифических антител против HLA-A2:HPV16E7 к мономерному пептидному комплексу HLA-A2/HPV16E7 показаны ниже в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Аффинности связывания на основе Вiasoge антител  
против HLA-A2/HPV16E7 (11-19) при 25°C

Антитело	HLA-A2:HPV16E7(11-19)			
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	t1/2 (мин)
H4sH17670P	8,16E+04	1,43E-03	1,75E-08	8,1
H4sH17672P	1,29E+05	8,19E-04	6,37E-09	14,1
H4sH17673P	NB	NB	NB	NB
H4sH17675P	5,99E+04	1,38E-03	2,31E-08	8,4
H4sH17680P	NB	NB	NB	NB
H4sH17697P	NB	NB	NB	NB
H4sH17707P	NB	NB	NB	NB
H4sH17715P	NB	NB	NB	NB
H4sH17726P	NB	NB	NB	NB
H4sH17730P	NB	NB	NB	NB
H4sH17363N	8,72E+04	1,54E-03	1,76E-08	7,5
H4sH17364N	8,56E+04	1,57E-03	1,83E-08	7,4
H4sH17368N2	NB	NB	NB	NB
H4sH17368N3	NB	NB	NB	NB
H4sH17930N	7,84E+04	7,96E-04	1,02E-08	14,5
H4sH17930N2	8,28E+04	7,92E-04	9,57E-09	14,6
H4sH21051P	NB	NB	NB	NB
H4sH21054P	NB	NB	NB	NB
H4sH21055P	NB	NB	NB	NB
H4sH21058P	NB	NB	NB	NB
H4sH21064P	5,47E+04	7,91E-04	1,44E-08	14,6
H4sH21073P	NB	NB	NB	NB
H4sH21077P	NB	NB	NB	NB
H4sH21079P	3,74E+04	1,09E-02	2,90E-07	1,1
H4sH21080P	1,79E+05	3,90E-02	2,18E-07	0,3
H4sH21083P	NB	NB	NB	NB
H4sH21086P	NB	NB	NB	NB
H4sH21090P	NB	NB	NB	NB
H4sH21091P	NB	NB	NB	NB
H4sH21093P	NB	NB	NB	NB
H4sH21099P	NB	NB	NB	NB
H4sH21100P	NB	NB	NB	NB
H4sH21103P	NB	NB	NB	NB
H4sH21104P	NB	NB	NB	NB

\* NB указывает, что при экспериментальных условиях пептидный реагент HLA-A2:HPV16E7(11-19) не связывается с захваченным мноклональным антителом против HLA-A2:HPV16E7.

Анализы связывания Вiascore антител против  
HLA-A2/HPV16E7 (82-90) при 25°C

HLA-A2:HPV16E7(82-90)				
Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)	t1/2 (мин)
H4sH17670P	NB	NB	NB	NB
H4sH17672P	NB	NB	NB	NB
H4sH17673P	NB	NB	NB	NB
H4sH17675P	NB	NB	NB	NB
H4sH17680P	NB	NB	NB	NB
H4sH17697P	NB	NB	NB	NB
H4sH17707P	7,15E+04	3,61E-04	5,05E-09	32,0
H4sH17715P	4,58E+04	5,68E-04	1,24E-08	20,3
H4sH17726P	5,17E+04	4,19E-04	8,10E-09	27,6
H4sH17730P	NB	NB	NB	NB
H4sH17363N	NB	NB	NB	NB
H4sH17364N	NB	NB	NB	NB
H4sH17368N2	8,31E+05	1,92E-03	2,30E-09	6,0
H4sH17368N3	7,12E+05	1,22E-03	1,71E-09	9,5
H4sH17930N	NB	NB	NB	NB
H4sH17930N2	NB	NB	NB	NB
H4sH21051P	1,37E+04	3,31E-04	2,41E-08	34,9
H4sH21054P	1,98E+05	7,65E-04	3,86E-09	15,1
H4sH21055P	1,56E+05	1,21E-03	7,76E-09	9,6
H4sH21058P	2,46E+05	2,60E-04	1,06E-09	44,5
H4sH21064P	NB	NB	NB	NB
H4sH21073P	5,77E+05	1,15E-04	2,00E-10	100,3
H4sH21077P	NB	NB	NB	NB
H4sH21079P	NB	NB	NB	NB
H4sH21080P	NB	NB	NB	NB
H4sH21083P	5,38E+04	2,12E-04	3,94E-09	54,5
H4sH21086P	6,97E+04	1,14E-03	1,63E-08	10,2
H4sH21090P	8,11E+04	1,91E-04	2,35E-09	60,6
H4sH21091P	1,74E+05	1,46E-04	8,42E-10	79,1
H4sH21093P	1,18E+05	1,92E-03	1,63E-08	6,0
H4sH21099P	1,24E+05	9,79E-05	7,88E-10	118,0
H4sH21100P	2,90E+05	1,82E-04	6,26E-10	63,5
H4sH21103P	8,35E+05	3,22E-03	3,86E-09	3,6
H4sH21104P	4,36E+04	2,15E-04	4,94E-09	53,7

\* NB указывает, что при экспериментальных условиях пептидный реагент HLA-A2:HPV16E7(82-90) не связывается с захваченным мноклональным антителом против HLA-A2:HPV16E7.

Данные демонстрируют, что большинство из антител против HLA-A2/HPV16E7 по настоящему изобретению связывались с растворимым пептидным комплексом HLA-A2/HPV16E7, причем некоторые демонстрировали суб-наномолярную аффинность. Некоторые антитела однако демонстрировали отсутствие связывания с комплексом HLA-A2/HPV16E7.

Пример 5. Прогнозирование потенциальных нецелевых пептидов.

Учитывая целевой 9-мерный комплекс пептид-HLA-A2, связанный с ним потенциальный нецелевой пептид определяется на основе трех критериев: А) пептид является 9-мерным и, по прогнозам, связывается с HLA-A2, В) пептид похож на целевой пептид на основе гомологии последовательностей, и С) пептид получен из гена, который экспрессируется в основных нормальных тканях. Таким образом, для прогнозирования потенциальных нецелевых пептидов, ассоциированных с YMLDLQPET (HPV16 E711-19; SEQ ID NO: 538) и с LLMGTLGIV (HPV16 E782-90; SEQ ID NO:539), использовали следующую методику (в основном, см., Dhanik, Ankur, et al. (2016) BMC Bioinformatics 17(1): 286).

В качестве первой стадии канонические человеческие белковые последовательности загружали из базы данных UniprotKB (version September 2014) (Magrane, Michele, and UniProt Consortium. Database 2011 (2011): bar009) и выделяли все 9-меры. Это привело к получению 11118076 пептидов из 20014 белковых последовательностей.

Затем аффинности связывания пептидов с HLA-A2 рассчитывали с использованием вебсервера NetMHCstab (версия 1.0) (Jnrgensen, Kasper W., et al. (2014) Immunology 141(1): 18-26). Было предсказано, что пептиды со значением аффинности <500 нМ связываются с HLA-A2, а остальные отбрасываются, что приводит к получению оставшихся 338452 пептидов.

Затем пептидные последовательности оценивали на гомологию последовательности с целевым пептидом. Для каждого пептида его степень сходства (DoS) рассчитывали для целевого пептида. Значение

DoS представляет количество идентичных аминокислот в идентичных положениях между двумя пептидами. Пептиды со значением DoS <6 были отклонены, в результате чего оставшийся 21 пептид в случае HLA-A2/HPV16E7: 11-19 и 78 пептидов в случае HLA-A2/HPV16E7: 82-90.

Гены, соответствующие 21 пептиду, были проверены на предмет их экспрессии в основных нормальных тканях. Оценку экспрессии проводили с использованием данных об экспрессии генов, полученных из баз данных GTEx (Экспрессия генов в тканях) и TCGA (Атлас ракового генома), предоставленных OmicSoft (Hu, Jun, et al. Bioinformatics (2012) 28(14):1933-1934). Данные были доступны в значениях RPKM (чтения на тысячу пар оснований на миллион) из 497 смежных нормальных образцов TCGA (по 15 основным типам тканей) и 2928 нормальных образцов GTEx (по 22 основным типам тканей). Ткани, кроме молочной железы, шейки матки, маточной трубы, яичка, матки и влагалища, считались необходимыми. Ген считали экспрессируемым в основных нормальных тканях, если максимум 95-процентной экспрессии в каждом важном типе нормальной ткани в базах данных GTEx и TCGA составляет  $\geq 0,5$  RPKM. Для HLA-A2/HPV16E7: 11-19 (YMLDLQPET) из 21 пептида 10 пептидов были получены из генов, которые экспрессируются в основных нормальных тканях. Для HLA-A2/HPV16E7: 82-90 (LLMGTLGIV) из 78 пептидов 49 пептидов были получены из генов, которые экспрессируются в основных нормальных тканях.

Эти 10 пептидов составляют предсказанные нецелевые пептиды, связанные с целевым комплексом YMLDLQPET-HLA-A2 (табл. 7). Из 49 потенциальных пептидов, которые, по прогнозам, составляют вероятные нецелевые пептиды, связанные с комплексом LLMGTLGIV-HLA-A2, 13 были выбраны случайным образом для экспериментальной проверки и перечислены в табл. 8.

Таблица 7  
Предсказанные нецелевые пептиды, подобные HLA-A2/HPV16E7:  
11-19 (YMLDLQPET; SEO ID NO: 538)

No	Последовательность пептида	Название пептида	Ген	Прогнозируемая IC <sub>50</sub> (нМ)
1	YMLDLQKQL (SEQ ID NO: 546)	SH3GLB1:244-252	SH3GLB1	9,2
2	KMLDKNPET (SEQ ID NO: 547)	CAMKK1:388-396	CAMKK1	107,9
3	YMFDLLLET (SEQ ID NO: 548)	USP47:691-699	USP47	3,5
4	YTLDLQLEA (SEQ ID NO: 549)	CHPF:463-471	CHPF	132,8
5	MMLILQAET (SEQ ID NO: 550)	PKD1:2694-2702	PKD1	244,3
6	LMLPLQPCT (SEQ ID NO: 551)	NBR1:357-365	NBR1	487,8
7	YILDLLPDT (SEQ ID NO: 552)	CBL:83-91	CBL	145,9
8	YMEDLQELT (SEQ ID NO: 553)	PPP4R4:20-28	PPP4R4	482,1
9	GLLDLDPET (SEQ ID NO: 554)	SBK3:285-293	SBK3	91,6
10	VMKDLLPET (SEQ ID NO: 555)	FNDC3B:921-929	FNDC3B	379,9

Таблица 8  
Предсказанные нецелевые пептиды, подобные HLA-A2/HPV16E7:  
82-90 (LLMGTLGIV; SEO ID NO: 539)

No.	Последовательность пептида	Название пептида	Ген	Прогнозируемая IC <sub>50</sub> (нМ)
1	LLMGFLSV (SEQ ID NO: 556)	VPREB3:9-17	VPREB3	5.9
2	LLGGTLERV (SEQ ID NO: 557)	B4GALT2:4-12	B4GALT2	93.6
3	LLMGSTNIV (SEQ ID NO: 558)	GCAT:312-320	GCAT	13.2
4	LLQATLDIV (SEQ ID NO: 559)	CYP39A1:246-254	CYP39A1	88.7
5	LLLTLGIV (SEQ ID NO: 560)	ALDH3A2:467-475	ALDH3A2	85.4
6	LLAGTLGV (SEQ ID NO: 561)	CLCN4:79-87	CLCN4	11.0
7	LLQDTLGHV (SEQ ID NO: 562)	ZHX2:234-242	ZHX2	50.5
8	LLAVLGIV (SEQ ID NO: 563)	GRM6:590-598	GRM6	64.4
9	LVMETLCIV (SEQ ID NO: 564)	IPO9:582-590	IPO9	18.8
10	LLNETLGEV (SEQ ID NO: 565)	IPO4:163-171	IPO4	25.8
11	KLMGHLGVV (SEQ ID NO: 566)	SF3B1:969-977	SF3B1	11.2
12	LLMCYLYIV (SEQ ID NO: 567)	DOCK11:1282-1290	DOCK11	2.7
13	LLNKVLGIV (SEQ ID NO: 568)	Human CNOT1:1962-1970	CNOT1	247.8

Пример 6. Стимулирование пептидом клеток T2 для определения специфичности HLA-A2/HPV16E7 M.

Чтобы определить специфичность моноклонального антитела против HLA-A2/HPV16E7, использовали стимулированные пептидом клетки T2, загруженные целевыми или нецелевыми пептидами (идентифицированными в предыдущем Примере). Эксперименты проводили следующим образом: Для экзогенной загрузки целевого HPV16E7 или нецелевых пептидов клетки T2 промывали в среде AIM V® и подсчитывали с помощью счетчика клеток Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom Bioscience). Приблизительно 6 миллионов клеток T2 на колбу T-75 культивировали в течение 24 часов при 26°C в 9 мл среды AIM V®, содержащей 10 мкг человеческого b2m и 100 мкг пептида HPV16E7 или нецелевого пептида (табл. 6 и 7). Загруженные пептидом клетки T2 промывали один раз PBS без Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> и подсчитывали. Приблизительно 10000 клеток на лунку загруженных пептидом T2 или необработанных T2 в буфере для промывания клеток высевали в 96-луночные планшеты с угольными электродами (MULTI-ARRAY с высокой степенью связывания, MSD) и инкубировали в течение 1 часа при 37°C, чтобы позволить клеткам прикрепиться к планшету. Сайты неспецифического связывания блокировали с использованием 2% BSA (вес/объем) в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре. К клеткам, связанным с планшетами, добавляли растворы антитела против HLA-A2/HPV16E7: 11-19, антитела против HLA-A2/HPV16E7: 82-90 или контрольного антитела в серийных разведениях в диапазоне от 1,7 мкМ до 100 нМ, а также растворы без антитела. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, затем промывали для удаления несвязанного антитела, используя промыватель для планшетов AquaMax2000 (MDS Analytical Technologies). Антитела, связанные с планшетом, детектировали с помощью козьего поликлонального антитела против человеческого IgG, конъюгированного с SULFO-TAG, специфичного для Fc-гамма-фрагмента (Jackson ImmunoResearch, Meso Scale Discovery) в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки планшеты проявляли с помощью буфера считывания (MSD) в соответствии с рекомендуемой изготовителем процедурой, а люминесцентные сигналы записывали с помощью прибора SECTOR Imager 600 (Meso Scale Discovery). Интенсивность люминесценции, измеренную в относительных световых единицах (RLU), регистрировали, чтобы указать интенсивность связывания каждого антитела в диапазоне концентраций. Отношение сигнала связывания клеток для каждого антитела против HLA-A2/HPV16E7 по сравнению с контролем изотипа при 11 нМ приведено в табл. 8 и 9 и является показателем специфичности. При концентрации 11 нМ большинство антител проявляли минимальное связывание с необработанными клетками T2. Не все антитела были протестированы со всеми соответствующими родственными нецелевыми пептидами. Те, которые не были протестированы, помечаются как NT "Не протестировано". Антитела с коэффициентом связывания выше чем 15 помечены (+++), с коэффициентом, равным или меньшим чем 15, но больше или равным 10, помечены (++), с коэффициентом меньше чем 10, но больше или равным 3, помечены (+), а антитела с коэффициентом связывания менее чем 3 были классифицированы как не связывающиеся и обозначены как (-). Кроме того, сигналы прямого связывания (в RLU) анализировали как функцию концентрации антител и данных, подобранных к сигмоидальной (четырёхпараметрической логистической) модели доза-ответ с использованием GraphPad Prism™. Значения EC<sub>50</sub>, определенные как концентрация антитела, при которой детектируется 50% максимального сигнала связывания на клетках, определяли, где это возможно, для обозначения активности каждого антитела. Значения EC<sub>50</sub> для связывания с HLA-A2/HPV16E7:11-19 клеточной поверхности или только HLA-A2/HPV16E7:82-90 также приведены в табл. 9 и 10.

Десять из 13 антител против HLA-A2/HPV16E7:11-19 по изобретению связываются с комплексом HLA-A2/пептид на клеточной поверхности T2-клеток. Семь из этих 10 антител (H4sH17670P; H4sH17675P; H4sH17363N; H4sH17364N; H4sH17930N; H4sH17930N2; и H4sH21064P являются специфическими для комплекса HLA-A2/HPV16E7:11-19. Три антитела (H4sH17672P, H4sH21079P, H4sH21080P) показали более высокую активность со значениями EC<sub>50</sub> ниже 1,1 нМ. Три антитела (H4sH17673P, H4sH17680P, H4sH17697P) не связывались с нагруженными пептидом T2 клетками и обозначены (-) в первом столбце табл. 9.

Результаты связывания клеток на клетках T2, нагруженных целевым HPV16E7:82-90 и предсказанными нецелевыми пептидами, суммированы в табл. 9. Шестнадцать из 21 mAb антител против HLA-A2/HPV16E7:82-90 по изобретению связывались с комплексом HLA-A2/пептид на клеточной поверхности клеток T2. Только 2 mAb из этой группы (H4sH17368N2, H4sH21086P) показали специфичность к комплексу HLA-A2/HPV16E7 82-90. Пять антител (H4sH17730P, H4sH21051P, H4sH21054P, H4sH21055P, H4sH21077P) не связывались с нагруженными пептидом T2-клетками и обозначены (-) в табл. 10.



Таблица 9

Специфичность связывания моноклональных антител против HLA-A2/HPV16E7:11-19

AbPID	T2+HPV16E7 11-19	HPV16E7 11-19	SH3GLB1 244-252	CAMK1 388-396	USP47 691-699	CHPF 463:471	PKD1 2694-2702	NBR1 357-365	CBL 83-91	PPP4R4 20-28	SBK3 285-293	T2 необротанные	Связывание клеток EC <sub>50</sub> (M)	Специфичность связывания клеток T2+пептид по сравнению с нерелевантным hIgG4 контролем изотипа при 11нМ
H4sH17670P	1,3E-09	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H4sH17672P	4,5E-10	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		
H4sH17673P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H4sH17675P	1,1E-09	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H4sH17680P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H4sH17697P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H4sH17363N	2,1E-09	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H4sH17364N	2,0E-09	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H4sH17930N	3,1E-09	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H4sH17930N2	5,8E-09	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H4sH21064P	2,2E-09	+++	NT	NT	NT	-	NT	-	-	NT	NT	-		
H4sH21079P	1,1E-09	+++	NT	NT	NT	+	NT	-	+	NT	NT	-		
H4sH21080P	2,2E-10	++	NT	NT	NT	+	NT	-	+	NT	NT	-		
		Сигнал связывания клеток при 11 нМ, RLU												
Контроль изотипа	-	1029	976	772	1102	1077	1123	820	1104	1038	945	847		

Таблица 10

Специфичность связывания моноклональных  
антител против HLA-A2/HPV16E7:82-90

Связывание клеток окЕС	Специфичность связывания клеток Т2+пептид по сравнению с нерелевантным hlgG4 контролем изотипа при 11нМ															
	(M)															
AbPID	T2+HPV16E782-90	HPV16E782-90	VPREB39-17	B4GALTLT24-12	GCAT312-320	CYP39A1246-254	ALDH3A2467-475	CLCN479-87	ZHX2234-242	GRM6590-598	IP092-590	IP04163-171	SFB3B1969-977	DOCK111282-1290	CNOT11962-1970	Т2 неstimулирующие
H4sH17707P	2,3E-08	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
H4sH17715P	2,9E-10	++	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
H4sH17726P	4,1E-10	++	++	+	+	++	+	++	+	++	+	-	+	+	+	-
H4sH17730P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H4sH17368N2	7,5E-10	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H4sH17368N3	1,8E-10	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H4sH21051P	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-
H4sH21054P	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-
H4sH21055P	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-
H4sH21077P	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-
H4sH21086P	5,0E-10	++	-	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-
H4sH21090P	5,6E-10	++	-	-	NT	NT	NT	NT	++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-
H4sH21091P	1,7E-10	++	-	-	NT	NT	NT	NT	++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-
H4sH21093P	3,0E-10	++	-	-	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-
H4sH21058P	1,9E-10	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
H4sH21073P	9,0E-11	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
H4sH21083P	3,3E-10	++	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
H4sH21099P	8,7E-11	++	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
H4sH21100P	9,6E-11	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
H4sH21103P	4,5E-11	++	-	-	-	-	+	-	-	+	++	+	+	+	+	-
H4sH21104P	4,8E-10	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
		Сигнал связывания клеток при 11 нМ, RLU														
Контроль изотипа	-	835	871	926	872	562	856	725	797	807	768	1067	702	776	780	860

Как показано в табл. 9 и 10, антигенсвязывающие белки против HLA-A2:HPV16E7 по изобретению связываются с высокой специфичностью только с конкретным пептидом HPV (SEQ ID NO: 538 в табл. 9

или с SEQ ID NO: 539 в табл. 10), презентированными с помощью HLA-A2, и не связывается с какими-либо нецелевыми пептидами, не презентированными HLA-A2.

Пример 7. Анализ специфичности связывания с использованием стимулированных пептидом Т2-клеток и FACS-анализа.

Относительное связывание и специфичность антител к HPV16E7 определяли с помощью проточной цитометрии на клетках NIH3T3, экспрессирующих комплекс HLA-A2, презентующий либо пептид HPV 11-19 (3T3/HLA.A2/hB2M/HPV16E7:11-19), либо пептид HPV 82-90 (3T3 /HLA.A2/hB2M/HPV16E7 (82-90). Клетки NIH3T3, экспрессирующие комплекс HLA, получали путем трансфекции человеческого HLA.A2 (номер доступа P01892), B2M человека (номер доступа NP\_004039.1) и кассеты с пептидом убиквитина (Lévy F., et al. (1996) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(10):4907-4912; Valmori D, et al. (1999) *Journal of Experimental Medicine* 189 (6): 895-906), содержащий либо аминокислоты 11-19 HPV16E7 (SEQ ID NO: 538), либо аминокислоты 82-90 (SEQ ID NO: 539) (номер доступа AK185233) с использованием липофектомина 2000 (Invitrogen, Cat # 11668) с последующим отбором в течение по меньшей мере 2 недель с использованием 1 мкг/мл пурамицина, 500 мкг/мл G418 и 100 мкг/мл гигромицина. Для окрашивания клетки собирали, используя буфер для диссоциации клеток (Millipore, Cat # S-004-C), и подсчитывали. Клетки высевали в окрашивающий буфер (PBS, без кальция и магния (Irving 9240) + 2% FBS (ATCC 30-2020) при плотности 200000 клеток на лунку в 96-луночном планшете с V-образным дном и окрашивали трехкратными серийными разведениями (1,7 пМ - 100 нМ) первичных антител в течение 30 мин при 4°C. После первичной инкубации антител клетки промывали один раз в буфере для окрашивания и окрашивали вторичным антителом, конъюгированным с Alexa-Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch, Cat # 109-606-170), при 10 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. Затем клетки промывали и фиксировали с использованием 50% раствора BD Cytifix (BD, Cat # 554655), разведенного в окрашивающем буфере. Образцы прогоняли и анализировали на проточном цитометре iQue intelligyt для расчета средней интенсивности флуоресценции (MFI). Значения MFI были построены в Graphpad Prism с использованием логистического уравнения с четырьмя параметрами по кривой отклика из 12 точек для расчета значений EC<sub>50</sub>. Одно вторичное антитело (т.е. не первичное антитело) для каждой кривой доза-ответ также включено в анализ как продолжение трехкратного серийного разведения и представлено как самая низкая доза. Значения EC<sub>50</sub> (M) и максимальное кратное связывание (кратное изменение от самой высокой дозы до самой низкой) показано в табл. 11. Несколько антител специфически связывались либо с линией клеток 3T3/HLA.A2/hB2M/HPV16E7:11-19, либо с линией 3T3/HLA.A2/hB2M/HPV16E7:82-90. Значения EC<sub>50</sub> варьировались от 5-500 нМ, а кратность связывания составляла от 1X до 43,8X.

Таблица 11

## FACS-связывание антител против HPV16E7

Обозначение антитела	3Т3/HLA.A2/нВ2М/Н PV16E7 (11-19)		3Т3/HLA.A2/нВ2М/Н PV16E7 (82-90)		HEK293	
	EC <sub>50</sub>	Мах кратность	EC <sub>50</sub>	Мах кратность	EC <sub>50</sub>	Мах кратность
*H4sH17363N	1,40E-08	11,4	ND	1,7	ND	1,3
*H4sH17364N	2,40E-08	11,4	2,91E-08	2,3	ND	1,2
H4sH17368N2	ND	1,8	1,94E-07	9,1	ND	1,8
H4sH17368N3	ND	1,1	3,26E-08	6,1	ND	1,7
*H4sH17670P	2,37E-08	6,7	ND	1,5	ND	0,8
H4sH17672P	3,72E-08	10,2	ND	1,4	ND	1,6
H4sH17673P	ND	1,8	ND	1,3	ND	1,6
*H4sH17675P	1,27E-08	5,1	ND	1,3	ND	0,65
H4sH17680P	ND	1,5	ND	1,1	ND	1
H4sH17697P	ND	1,2	ND	1,5	ND	1,1
H4sH17707P	ND	1,5	ND	1,8	ND	2
H4sH17715P	ND	1,7	6,60E-06	6,7	3,47E-08	3,1
H4sH17726P	5,20E-08	28,11	7,19E-08	43,8	ND	2,0
H4sH17730P	ND	0,9	5,80E-08	2,9	ND	0,9
H4sH17930N	1,73E-08	13,5	6,62E-08	10,3	1,53E-07	4,3
*H4sH17930N2	2,78E-08	11,4	7,48E-08	3	3,93E-08	3
H4sH21051P	ND	1,2	ND	2,0	ND	1,2
H4sH21054P	ND	3,8	ND	4,9	3,51E-08	3,6
H4sH21055P	ND	1,4	ND	1,5	ND	1,9
H4sH21058P	ND	1,3	1,01E-08	8,6	ND	0,9
*H4sH21064P	2,05E-08	12,3	6,60E-08	2,2	ND	0,7
H4sH21073P	ND	0,9	4,09E-08	6,5	ND	0,9
H4sH21077P	ND	2,0	ND	1,5	ND	1,6
H4sH21079P	4,02E-08	26,6	5,40E-08	20,5	ND	1,3
H4sH21080P	3,10E-08	11,7	2,11E-08	7,4	5,19E-08	4,4
H4sH21083P	ND	1,5	3,31E-09	8,5	ND	1,4
H4sH21086P	5,53E-08	14,6	3,49E-07	22	ND	1,3
H4sH21090P	ND	1,6	1,85E-09	6,25	ND	1,1
H4sH21091P	ND	1,5	3,74E-10	5,6	ND	1,6
H4sH21093P	ND	1,9	2,95E-08	3,9	ND	1,4
H4sH21099P	ND	1	1,19E-09	4,8	ND	2
H4sH21100P	3,55E-08	4,4	1,19E-08	10,3	ND	0,7
H4sH21103P	ND	1,6	9,20E-09	6,3	ND	1,5
H4sH21104P	ND	1,6	5,481E-09	8,5	ND	1
Контроль	ND	1	ND	1	ND	1,2

Антитела с (\*) прогоняли вместе в отдельном эксперименте.

ND=EC<sub>50</sub> Не определено, когда максимальное кратное связывание было меньше или равно 2-кратному.

Специфичность шести антител против HPV16E7:11-19 была дополнительно охарактеризована путем оценки связывания с клетками T2 (174 СЕМ.Т2), стимулированными HPV16E7:11-19, HPV16E7:82-90 или предсказанными нецелевыми пептидами (табл. 7). Для стимулирования T2 (174 СЕМ.Т2) повторно суспендировали в среде AIM V при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл (Gibco. Cat # 31035-025). Клетки стимулировали путем добавления 10 мкг/мл нВ2М (EMD Millipore Cat # 475828) и 100 мкг/мл указанного пептида. Затем клетки T2 инкубировали в течение ночи при 26°C, промывали в окрашивающем буфере и окрашивали указанными антителами в концентрации 10 мкг/мл в соответствии с протоколом, описанным выше. Значения MFI были рассчитаны и представлены как кратное изменение для неокрашенных клеток. Относительное связывание шести антител против HPV16E7:11-19 на клетках T2, стимулированных с HPV16E7:11-19, в 986-1200 раз выше неокрашенных клеток. Никакого значительного связывания выше контроля изотипа не наблюдалось на клетках T2, стимулированных другими пептидами (табл. 12).

Таблица 12

FACS Связывание антител HPV16E7 с стимулированными клетками T2 (кратное изменение относительно неокрашенных)

	HPV16 E7:11- 19 YMLD LQPET	SH3G LB1 244- 252	CAM KK1 388- 396	USP 47 691- 699	CHP F 463: 471	PK D1 269 4- 270 2	NB R1 357 - 365	CBL 83- 91	PP P4 R4 20- 28	SB K3 285 - 293	Не стиму- лиро- ван- ные клетк- и
H4sH1736 3N	1001,4	13,6	2,0	0,6	7,4	1,2	3,6	19,5	6,1	0,4	8,5
H4sH1736 4N	986,1	15,2	1,0	1,3	10,9	1,0	3,0	23,9	9,0	0,8	11,7
H4sH1767 0P	1005,5	3,7	2,9	5,3	3,6	3,5	2,2	2,0	2,9	2,6	5,0
H4sH1767 5P	1204,2	10,5	2,4	13,3	5,0	2,9	2,2	4,9	5,5	2,9	7,2
H4sH1793 0N2	1166,7	28,2	2,6	8,9	7,5	3,3	3,3	4,6	7,3	3,0	6,7
H4sH2106 4P	1204,2	10,5	2,4	13,3	5,0	2,9	2,2	4,9	5,5	2,9	7,2
Контроль изотипа	17,1	8,5	6,3	11,5	9,9	9,8	8,7	9,0	8,0	6,8	10,2
Только	14,2	3,7	5,8	5,2	4,8	4,4	3,7	4,4	4,0	4,1	6,5
вторичные											
Не окрашено	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Пример 8. Анализ эпитопа с использованием аланин-сканирующих пептидов.

Аланиновое сканирование было выполнено, чтобы определить, какие остатки в пептиде HPV16E7:11-19 были критическими для связывания антител. Клетки T2 были стимулированы аланин-сканирующими пептидами и окрашены антителами к HPV16E7:11-19, как описано выше. Были использованы следующие аланин-сканирующие пептиды (табл. 13).

Таблица 13

Аланин-сканирующие пептиды, использованные в исследовании

SEQ ID NO:	Пептид	Ala замена
569	AMLDLQPET	Y11A
570	YALDLQPET	M12A
571	YMADLQPET	L13A
572	YMLALQPET	D14A
573	YMLDAQPET	L15A
574	YMLDLAPET	Q16A
575	YMLDLQAET	P17A
576	YMLDLQPAT	E18A
577	YMLDLQPEA	T19A

Превращение аспартата 14 в аланин (D14A) и глутамин 16 в аланин (Q16A) значительно снижает связывание антител для всех тестируемых антител. Превращение тирозина 11 в аланин (Y11A) снижает связывание H4sH17670P, H4sH17675P, H4sH21064P и H4sH17930N2; но не H4sH17363N или H4sH17364N. Превращение лейцина 13 в аланин (L13A) и пролина 17 в аланин (P17A) снижает общее связывание антител (табл. 14).

Подводя итог, D14 и Q16 являются критическими остатками для связывания антител.

Таблица 14

FACS Связывание антител HPV16E7 с клетками T2, стимулированными аланин-сканирующими пептидами

	AML DLQP ET (Y11 A)	YAL DLQP ET (M12 A)	YMA DLQP ET (L13A )	YML ALQP ET (D14 A)	YMLD AQPET (L15A)	YMLD LAPE T (Q16A )	YML DLQ AET (P17A )	YML DLQP AT (E18A )	YML DLQP EA (T19)
H4sH1736 3N	694,8	998,5	529,9	58,2	1019,3	13,3	401,8	775,7	1034,3
H4sH1736 4N	708,3	997,9	489,9	69,7	1008,4	13,2	384,8	756,2	1075,7
H4sH1767 0P	8,1	670,3	374,9	10,7	1062,8	6,2	168,8	614,7	1150,1

H4sH1767 5P	19,0	823,8	527,2	6,3	1153,1	5,8	371,1	808,3	1165,0
H4sH1793 0N2	39,0	972,9	665,7	5,8	1245,9	6,8	531,9	1035,4	1330,3
H4sH2106 4P	19,0	823,8	527,2	6,3	1153,1	5,8	371,1	808,3	1165,0
Контроль изотипа	14,4	10,9	8,4	9,9	8,1	9,0	8,2	9,1	9,6
Только вторичные	9,7	6,9	4,9	6,4	6,3	5,5	4,6	4,5	6,5
Не окрашено	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Пример 9. Переформатирование антител HLA-A2/HPV16E7 в ScFv для использования в химерных антигенных рецепторах.

Шесть антител против HLA-A2/HPV16E7:11-19 (17363N, 17364N, 17670P, 17675P, 17930N2 и 21064P) были переформатированы в одноцепочечные вариабельные фрагменты VL-VH (ScFv) и помещены в конструкцию химерного антигенного рецептора (CAR), которая использовала шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий домен 4-1BB и стимулирующий домен CD3 $\zeta$ , (SEQ ID NO: 540-545). Специфичные HLA-A2/HPV16E7: 11-19 CAR были клонированы в лентивирусный экспрессирующий вектор (Lenti-X™ с бицистронной экспрессирующей системой (Neo), Clontech Cat # 632181), и лентивирусные частицы были получены с помощью системы упаковки Lenti-X Packaging Single-Shot (VSV-G) (Clontech Cat # 631276) в соответствии с протоколами производителя. Клетки Jurkat, сконструированные для экспрессии NFAT-люциферазного репортера (Jurkat/NFATLuc cl.3C7), затем трансдуцировали 6 различными конструкциями CAR с использованием чашек с предварительно нанесенным покрытием RetroNectin® (Clontech, Cat # T110a) в соответствии с протоколами производителя. После отбора в течение по меньшей мере 2 недель с использованием 500 мкг/мл G418 (Gibco, Cat # 11811-098) были получены CAR-T-клеточные линии.

Активность CAR-T-линий оценивали в биоанализе CAR-T/Антиген-презентирующие клетки (APC).

Для проведения биоанализа 50000 клеток Jurkat/NFATLuc cl. 3C7 CAR-T добавляли в 96-луночные белые планшеты Thermo-Nunc (Thermo Scientific, Cat # 136101) в 50 мкл аналитической среды (среда RPMI с 10% FBS и 1% P/S/G) с последующим добавлением 3-кратного серийного разведения APC (150000 клеток на 200 клеток) в 50 мкл аналитической среды. Были использованы следующие APC: CASKI (HLA-A2+/HPV16+), клетки CASKI, сверхэкспрессирующие одноцепочечный вариант HLA-A2, презентующих пептид 11-19 или 82-90, HEK293 (HLA-A2+/HPV16-) или C33a (HLA-A2+/HPV16-). Смесь клеток инкубировали в увлажненном инкубаторе с температурой 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 часов. Активность NFAT-люциферазы измеряли с использованием Promega One-Glo (Cat # E6130) и планшетридера Perkin Elmer Envision. Относительные единицы люциферазы (RLU) генерировали и наносили на график в Graphpad Prism, используя четырехпараметрическое логистическое уравнение по 8-точечной кривой отклика для вычисления значений EC<sub>50</sub>. Условие, соответствующее нулю APC, для каждой кривой доза-эффект также включено в анализ как продолжение трехкратного серийного разведения и представлено как самая низкая доза. Максимальная кратность активации была определена путем отношения наибольшего значения RLU на кривой к наименьшему. Все шесть клеточных линий HLA-A2/HPV16E7: 11-19 CAR-T были активированы клетками CASKI, которые сверхэкспрессировали пептид HPV16E7:11-19 с максимальной кратностью активации 2,5-32,3 раза. Никакие клеточные линии CAR-T не активировались APC, которые сверхэкспрессировали пептид HPV16E7: 82-90, или клетками HEK293 и C33a. Интересно, что одна клеточная линия CAR-T, в которой использовался ScFv из антитела 17675P, была активирована нативными клетками CASKI с кратной активацией 4,1 и EC<sub>50</sub> клеток 68654 (табл. 15).

Таблица 15

Активация CAR-T HPV16E7 (11-19) в биоанализе CAR-T/APC  
Jurkat/NFATLuc конструкция химерного антигенного рецептора

	17363N		17364N		17670P		17675P		17930N2		21064P	
APC	EC50 (клетки)	Кратность активации	EC50 (клетки)	Кратность активации	EC50 (клетки)	Кратность активации	EC50 (клетки)	Кратность активации	EC50 (клетки)	Кратность активации	EC50 (клетки)	Кратность активации
CASKI	ND	0,9	ND	1	ND	0,8	68654	4,1	ND	0,9	ND	1,2
CASKI 11-19	5108	2,5	6632	10,4	4145	8,5	9703	32,3	7885	16,8	7220	20,7
CASKI 82-90	ND	0,9	ND	1	ND	0,9	ND	1,5	ND	0,7	ND	0,9
HEK293	ND	0,8	ND	0,9	ND	0,8	ND	0,7	ND	0,7	ND	0,8
C33a	ND	0,7	ND	1,2	ND	0,8	ND	0,6	ND	0,6	ND	0,4

ND=EC<sub>50</sub> Не определено, когда макс, кратное связывание было меньше или равно 2-кратному.

Увеличение количества HPV16E7:11-19 презентированного пептида HLA-A2 должно привести к увеличению активации HLA-HPV16E7:11-19 CAR. Сообщалось, что гамма-интерферон может увеличивать презентацию антигена молекулами MHC класса 1, несмотря на активацию протеасомы (Früh K. and Yang Y. (1999) *Curr Opin Immunol.* 11(1): 76-81). На основании этого наблюдения было определено, могут ли клетки CASKI дикого типа или клетки HEK293, предварительно обработанные гамма-интерфероном, привести к повышенной активации клеточных линий CAR-T. Клетки CASKI и клетки HEK293 предварительно обрабатывали рекомбинантным человеческим IFN- $\gamma$  (Peprotech Cat # 300-02) в количестве 500 единиц/мл в течение 48 часов, а затем использовали в биоанализе CAR-T/APC, как описано выше (табл. 16). Клетки CASKI, предварительно обработанные IFN- $\gamma$ , активируют все 6 линий клеток CAR-T HPV16E7: 11-19 с кратной активацией в диапазоне 2,4-10,6.

Таблица 16

Активация HPV16E7 (11-19) CAR-T в присутствии IFN- $\gamma$

	CASKI		CASKI+IFN-g		HEK293		HEK293+IFN-g	
Jurkat/NFATLuc CART	EC50 (клетки)	Макс кратность	EC50 (клетки)	Макс кратность	EC50 (клетки)	Макс кратность	EC50 (клетки)	Макс кратность
17363N	ND	1,0	51837	2,4	ND	1,0	ND	0,81
17364N	ND	1,0	6440	5,6	ND	0,86	ND	0,75
17670P	ND	1,0	51360	2,7	ND	0,77	ND	0,78
17675P	13844	1,77	64903	10,6	ND	0,81	ND	0,71
17930N2	ND	0,97	57186	8,1	ND	0,75	ND	0,71
21064P	ND	1,0	55863	8,97	ND	0,8	ND	0,7

ND=EC<sub>50</sub> Не определено, когда макс, кратное связывание было меньше или равно 2-кратному.

Чтобы дополнительно оценить специфичность HPV16E7: 11-19 CAR-T-линий в анализе люциферазы, мы использовали клетки T2 в качестве APC и стимулировали с предсказанными нецелевыми пептидами (табл. 17). Вкратце, клетки T2 стимулировали трехкратным серийным разведением указанных пептидов (от 1,7 до 100 нг/мл). После стимулирования 50000 клеток CAR-T добавляли в 96-луночные белые планшеты Thermo-Nunc (Thermo Scientific, Cat # 136101) в 50 мкл среды для анализа. Затем 50000 стимулированных T2-клеток добавляли в планшеты в 50 мкл среды для анализа. Смесь клеток инкубировали в увлажненном инкубаторе с температурой 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 часов. Активность NFAT-люциферазы определяли с использованием Promega One-Glo (Cat # E6130) и планшет-ридера Perkin Elmer Envision. RLU наносили на график в Graphpad Prism с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 12-точечной кривой отклика для расчета значений EC<sub>50</sub>. Нестимулированное состояние для каждой кривой доза-эффект также включается в анализ как продолжение трехкратного серийного разведения и представляется как самая низкая доза. Максимальная кратность активации опре-

делялась, как описано ранее. Все клеточные линии CAR-T были активированы клетками T2, стимулированными пептидом HPV16E7: 11-19. Линия Jurkat/NFATLuc CART, использующая ScFv из антитела 17364N, неспецифично активировалась клетками T2, стимулированными эндофилином-B 1 (SH3GLB1: 244-252), хондроитинсульфат-синтазой 2 (CHPF: 463: 471) и убиквитин-белковой лигазой E3 CBL (CBL: 83-91). Все другие линии клеток CAR-T не имели значительной активации ни с каким нецелевым пептидом.

Таблица 17

Макс. кратная активация HPV16E7 (11-19)  
CAR-T против стимулированных клеток T2

Пептид	Jurkat/NFATLuc конструкция химерного антигенного рецептора					
	17363N	17364N	17670P	17675P	17930N2	21064P
	Мах кратность активации					
HPV16E7:11-19	6,5	10,9	1,9	10,6	7,8	12,9
HPV16E7:82-90	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8
SH3GLB1:244-252	1,3	6,1	0,9	1,1	1,4	3,4
САМКК1:388-396	0,9	1,0	0,9	0,9	0,9	0,8
USP47:691-699	1,0	0,9	0,9	1,0	0,9	1,1
CHPF:463:471	1,1	5,2	0,9	1,0	0,9	1,1
PKD1:2694-2702	0,8	0,9	1,0	1,0	0,9	0,9
NBR1:357-365	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
CBL:83-91	1,3	7,2	0,9	1,1	0,9	1,5
PPP4R4:20-28	0,9	0,9	1,0	1,0	0,9	0,9
SBK3:285-293	1,0	0,9	1,0	1,0	0,9	0,9

Пример 10. Структурный анализ связывания Fab с пептидом HLA-A2+HPV16E7: 11-19.

В целях лучшего понимания специфических взаимодействий между антителом и HLA-пептидным комплексом были определены рентгенокристаллические структуры Fab-фрагмента антитела, связанного с HLA-A2/b2m, презентующего пептид HPV16E7: 11-19. Одна структура содержит Fab 17670P, а другая структура содержит Fab 17363N; вместе эти две структуры покрывают пространство последовательности шести антител, представленных выше (например, табл. 11 и 12). Все 9 остатков HLA-презентируемого пептида FLPV16E7: 11-19 отчетливо видны на картах электронной плотности как для структур 17670P, так и для 17363N. Даже при 2,9 Å (разрешение структуры 17670P) положение и идентичность пептидных остатков однозначны, и взаимодействия остаток-остаток могут быть точно определены. Структура 17363P составляет 2,6 Å, что позволяет повысить точность.

Fab 17670P и 17363N связываются с вершиной HLA-пептидного комплекса способом, очень похожим на способ, которым связывается TCR. Fab расположены и ориентированы почти одинаково друг к другу; оба выровнены достаточно параллельно к "рельсам", граничащим с пептидсвязывающей канавкой, и оба центрированы на связанном пептиде, причем CDR тяжелой цепи связываются с N-концевой половиной связанного пептида, а CDR легкой цепи связываются с C-концевой половиной пептида. Другие опубликованные комплексные структуры антител (например, коды PDB 1W72 и 4WUU) показывают, что антитело не должно покрывать весь HLA-презентированный пептид. Однако эти антитела только с частичным пептидным покрытием обладают плохой специфичностью, допуская значительные изменения в той части пептида, которая не контактирует с небольшой потерей аффинности связывания.

Структуры показывают, что тяжелые цепи Fab 17670P и 17363N связываются с остатками 11, 14, 15 в пептиде HPV16E7, тогда как легкие цепи Fab связываются с остатками 15, 17, 18. Не происходит Fab-контактов с боковыми цепями остатков 12, 13, 16 или 19, поскольку они указывают на молекулу HLA. Связанный пептид пронумерован в соответствии с положениями остатка в исходном белке E7 FTPV16 следующим образом:

Y M L D L Q P E T (SEQ ID NO:358)

11 12 13 14 15 16 17 18 19

Большинство контактов Fab осуществляется с пептидными боковыми цепями, а не с остовом.

Пептидные контакты, сделанные 17670P, сконцентрированы почти исключительно в CDR LCDR1 и HCDR3, особенно в HCDR3. В частности, остатки тяжелой цепи Fab 100, 101, 102, 105, 109, 110 SEQ ID NO: 34 и остатки легкой цепи 30, 31, 32, 50 SEQ ID NO: 42 контактируют со связанным пептидом, тогда как остатки тяжелой цепи Fab 28, 31, 32, 100, 102, 104, 109, 110, 113 SEQ ID NO: 34 и остатки легкой цепи 31, 50, 52, 53, 54, 55, 92 SEQ ID NO: 42 контактируют с HLA. "Контакт" в настоящем описании может включать прямые или опосредованные водой водородные связи, взаимодействия заряд-заряд или гидрофобные/ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Для 17363N остатки тяжелой цепи Fab 102, 103, 108, 111, 112 SEQ ID NO: 506 и остатки легкой цепи 28, 30, 32, 50, 68 SEQ ID NO: 514 связываются со связанным



пептидом, тогда как остатки тяжелой цепи Fab 28, 32, 100, 102, 103, 107, 112 SEQ ID NO: 506 и остатки легкой цепи 31, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 92 SEQ ID NO: 514 связываются с молекулой HLA.

Из шести антител против HLA-A2:HPV16E7: 11-19 17675P имеет наибольшее сходство с 17670P в последовательностях CDR, определяющих связывание пептидов, причем 21064P и 17930N2 также имеют высокую степень сходства в областях связывания пептида CDR. Ключевые контакты между 17670P и HLA-пептидным комплексом в основном консервативны в 17675P, 21064P и 17930N2, таким образом, способ связывания этих антител, вероятно, будет таким же, как у 17670P.

Напротив, CDR H3 17363N имеет очень отличающуюся последовательность по сравнению с CDR H3 17670P, и это различие последовательностей трансформируется в структурное различие CDR H3, изменяя контакты с HLA-пептидным комплексом в этой области. Например, Туг 100 тяжелой цепи в 17670P контактирует с Туг 11 связанного пептида. Эквивалентный остаток в 17363N представляет собой Туг 102 (CDR H3 этого антитела на два остатка длиннее), и этот остаток не контактирует с Туг 11 пептида. Вместо этого Туг 102 переориентировался на установление контактов с молекулой HLA поблизости.

Ведущее антитело 17364N имеет очень сходную последовательность с 17363N и идентично во всех остатках, контактирующих с HLA-пептидным комплексом. Это антитело должно иметь механизм связывания, очень похожий на механизм связывания 17363N, и, таким образом, отличаться от 17670P, 17675P, 17930N2 и 21064P.

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих чертежей. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида E7 вируса папилломы человека (HPV) 16 (пептид HPV16E7), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три области, определяющие комплементарность (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3); и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат набор аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и 16; 36, 38, 40, 44, 46 и 48; 84, 86, 88, 92, 94 и 96; 196, 198, 200, 204, 206 и 208; 284, 286, 288, 292, 294 и 296 и 508, 510, 512, 516, 518 и 520.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает свойством, выбранным из группы, состоящей из следующих:

(a) связывается с мономерным пептидом HLA-A2:HPV16E7 11-19 (SEQ ID NO: 538) с константой диссоциации (KD) менее чем примерно 20 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C;

(b) связывается с мономерным пептидом HLA-A2:HPV16E7 82-90 (SEQ ID NO: 539) с константой диссоциации (KD) менее чем примерно 25 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C;

(c) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:HPV16E7 11-19 (SEQ ID NO: 538), с EC<sub>50</sub> менее чем примерно 6 нМ и не связывается с клетками, экспрессирующими предсказанные нецелевые пептиды, как определено с помощью люминесцентного анализа;

(d) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:HPV16E7 82-90 (SEQ ID NO: 539), с EC<sub>50</sub> менее чем примерно 1 нМ и по существу не связывается с клетками, экспрессирующими предсказанные нецелевые пептиды, как определено с помощью люминесцентного анализа;

(e) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:HPV16E7 11-19 (SEQ ID NO: 538), с EC<sub>50</sub> менее чем примерно 30 нМ, как определено методом проточной цитометрии; и

(f) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:HPV16E7 82-90 (SEQ ID NO: 539), с EC<sub>50</sub> менее чем примерно 75 нМ, как определено методом проточной цитометрии.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающееся тем, что пептид HPV16E7 содержит аминокислотную последовательность YMLDLQPET (SEQ ID NO: 538).

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело, Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>, Fv, одноцепочечный Fv (scFv), конструкцию Т-тела или CAR.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, представляющее собой scFv.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее пару аминокислотных последовательностей варибельной области тяжелой цепи (HCVR)/варибельной области легкой цепи (LCVR) (HCVR/LCVR), причем аминокислотная последовательность HCVR и аминокислотная

последовательность LCVR каждой пары HCVR/LCVR, каждая независимо, по меньшей мере на 90% идентичны аминокислотным последовательностям пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/290, 298/306, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482, 490/498, 506/514 и 522/530.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, где аминокислотная последовательность HCVR и аминокислотная последовательность LCVR каждой пары HCVR/LCVR, каждая независимо, по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотной последовательности HCVR/LCVR пары аминокислотных последовательностей, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/290, 298/306, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482, 490/498, 506/514 и 522/530.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, где аминокислотная последовательность HCVR и аминокислотная последовательность LCVR каждой пары HCVR/LCVR, каждая независимо, по меньшей мере на 98% идентична аминокислотным последовательностям пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/290, 298/306, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482, 490/498, 506/514 и 522/530.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8, где аминокислотная последовательность HCVR и аминокислотная последовательность LCVR каждой пары HCVR/LCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/290, 298/306, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482, 490/498, 506/514 и 522/530.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 34/42, 82/90, 194/202, 282/290 и 506/514.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, дополнительно содержащее детектируемый фрагмент.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с HLA-A2:HPV16E7 по п.1, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

13. Способ лечения пациента, имеющего заболевание или расстройство, ассоциированное с HPV16E7, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.1 или фармацевтической композиции по п.12, тем самым подвергая пациента лечению.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что заболевание или расстройство, ассоциированное с HPV16E7, представляет собой злокачественное новообразование, ассоциированное с HPV.

15. Способ по п.14, в котором злокачественное новообразование, ассоциированное с HPV, представляет собой плоскоклеточный рак.

16. Способ по п.15, в котором злокачественное новообразование, ассоциированное с HPV, представляет собой рак шейки матки, аногенитальный рак, рак головы и шеи или рак ротоглотки.

17. Способ по п.13, отличающийся тем, что выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из ингибитора PD-1, ингибитора CTLA-4, антитела к опухолеспецифическому антигену, антитела к антигену вирусно-инфицированных клеток, ингибитора PD-L1, ингибитора CD20, биспецифического антитела против CD20 и CD3, биологически активной добавки, такой как антиоксидант, антагониста VEGF, химиотерапевтического агента, цитотоксического агента, хирургического вмешательства, лучевой терапии, NSAID, кортикостероида, вакцины против HPV и любой другой терапии, подходящей для уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома, связанного с заболеванием или расстройством.

19. Способ по п.13, в котором выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутривнутрино, перорально, внутримышечно или внутривнутрино.

20. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит внеклеточный связывающий домен, который специфически связывается с конформационным эпитопом HLA-A2-презентированного пептида E7 вируса папилломы человека (HPV) 16 (пептид HPV16E7), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, где внеклеточный связывающий домен включает человеческое моноклональное антитело против HLA-A2: HPV16E7 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1.

21. Экспрессирующий вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.20.
22. Выделенная иммунная эффекторная клетка, содержащая вектор по п.21.
23. Выделенная иммунная эффекторная клетка по п.22, которая представляет собой Т-тело.
24. Способ лечения пациента, имеющего заболевание или расстройство, ассоциированное с HPV, включающий введение пациенту иммунной эффекторной клетки по п.22 или 23.
25. Способ по п.24, отличающийся тем, что заболевание или расстройство, ассоциированное с HPV, представляет собой злокачественное новообразование, ассоциированное с HPV.
26. Способ по п.25, в котором злокачественное новообразование, ассоциированное с HPV, представляет собой плоскоклеточный рак.
27. Способ по п.25, в котором злокачественное новообразование, ассоциированное с HPV, представляет собой рак шейки матки, аногенитальный рак, рак головы и шеи или рак ротоглотки.
28. Способ по п.24, отличающийся тем, что выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

