

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390683** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.09.29

(22) Дата подачи заявки
2018.11.14

(51) Int. Cl. *C12N 15/10* (2006.01)
C40B 40/02 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(54) **ПОЛИПЕПТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ДОМЕН D, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/585,780**

(32) **2017.11.14**

(33) **US**

(62) **202091198; 2018.11.14**

(71) Заявитель:
ЭРСЕЛЛКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Хилберт Дэвид М., Суэрс Джеффри С.
(US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном изобретении предложены полипептиды (DDpp), содержащие домен D (DDpp), которые специфически связывают представляющие интерес мишени (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP и AFP p26), а также нуклеиновые кислоты, кодирующие DDpp, векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты и векторы. Также предложены DDpp, такие как слитые белки DDpp, как и способы изготовления и применения DDpp. Такие применения включают, но не ограничиваются ими, диагностические и терапевтические применения.

A1

202390683

202390683

A1

ПОЛИПЕПТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ДОМЕН D, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Реагенты на основе антител ускорили темпы биологических исследований и разработок. Композиции антител представляют собой один из наиболее важных и успешных классов терапевтических и диагностических агентов, используемых в фармацевтической промышленности. Однако стоимость, время и эффективность подталкивали на разработку альтернативных аффинных реагентов.

[0002] Для целей в которых традиционно использовались антитела, появилось множество форматов связывания не на основе антител. Хотя сообщалось о многих успехах с неструктурированными линейными пептидами, более надежные результаты были достигнуты путем наложения структурного ограничения на пептидную последовательность - обычно путем введения дисульфидной связи. Это ограничение обеспечивает более высокую аффинность и большую специфичность благодаря более благоприятной термодинамике комплементарности фиксированной формы и поверхностных представлений остатков (например, гидрофобных аминокислот), которые в противном случае могли бы быть скрыты и, следовательно, не обращены к мишени (Ladner, Trends in Biotech). 13(10): 426–430 (1995)). И наоборот, форматы, которые содержат дисульфидные связи, как правило, склонны к неправильному спариванию цистеинов, либо внутридоменных, либо междоменных, что может привести к снижению экспрессии, выхода продукта и качества продукта.

[0003] Структура, обнаруженная в белковых поддоменах, является еще одним источником структурных ограничений. Такие структуры, как повторы фибронектина типа III (аднектины), z-белки (аффитела), кноттины, липокалины (антикалины) и анкириновые повторы (DARPin), были разработаны с антителоподобным сродством к множеству различных мишеней. (Hey et al., Trends in Biotech. 23(10): 514–422 (2005)). Эти домены обычно содержат две черты, которые аналогичны каркасам и областям, определяющим комплементарность (CDR), обнаруженным в переменных доменах антител: структурный каркас, который придает высокую термодинамическую стабильность, и остатки или петли, которые составляют основу изменчивости библиотеки дисплея.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Остается существенная неудовлетворенная потребность в новых композициях, связывающих мишень, и особенно в таких агентах, содержащих альтернативные каркасы связывания (например, каркасы связывания не из антител). Агенты, представляющие особый интерес, могут характеризоваться, например,

существенно сниженными производственными затратами и/или сопоставимыми или превосходными реагентными, диагностическими и/или терапевтическими свойствами по сравнению с антителами. В данном изобретении предложены новые связывающиеся с мишенью полипептиды на основе домена D (DD), которые основаны на структурном каркасе не из антител. В некоторых вариантах осуществления полипептиды домена D (DDpp) характеризуются высокой аффинностью связывания с мишенью и структурным каркасом не из антител. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляют собой специфичные для мишени связывающие полипептиды, которые могут преимущественно использоваться для нацеливания терапевтических средств (например, иммунных клеток) на конкретные клетки (например, больные клетки), тем самым уменьшая или устраняя побочные эффекты. В некоторых вариантах осуществления предложены DDpp, которые применяются в качестве терапевтических средств для связывания клеток или растворимых факторов, вовлеченных в заболевание.

[0005] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к белку, содержащему домен связывания мишени на основе домена D (DD), причем DD специфически связывает представляющую интерес мишень, выбранную из группы, состоящей из BCMA (SEQ ID NO: 7), CD123 (SEQ ID NO: 8), CS1 (SEQ ID NO: 965), HER2 (SEQ ID NO: 967), AFP (SEQ ID NO: 9), p26 AFP (SEQ ID NO: 10) или их фрагмента. В некоторых вариантах DDpp являются одновалентными или мультивалентными. В некоторых вариантах DDpp являются моноспецифичными или мультиспецифичными. В дальнейших вариантах осуществления DDpp являются моноспецифичными или мультивалентными. В других вариантах осуществления DDpp являются мультиспецифичными и мультивалентными. Также предложены слитые белки, содержащие один или более DD, а также способы получения и применения слитых белков. Также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие DDpp и векторы, и клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты. Такие применения включают, но не ограничиваются ими, диагностические и терапевтические применения.

[0006] В дополнительном варианте осуществления, в данном изобретении предложен белок, содержащий домен связывания мишени на основе домена D (DD) (DDpp), причем DD представляет собой член, выбранный из группы, состоящей из: (a) DD, который специфически связывает BCMA (SEQ ID NO: 7) и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-305 или 306; (b) DD, который специфически связывает CD123 (SEQ ID NO: 8) и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 307-739 или 740; (c) DD, который специфически связывает AFP (SEQ ID NO: 9) или его фрагмент, и содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 741-874 или 886-895; (d) DD, который специфически связывает p26 AFP (SEQ ID NO: 10) и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 741-874 или 886-895; (e) DD, который специфически связывает CS1 (SEQ ID NO: 965) или его фрагмент, и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 896-909 или 910, и (f) DD, который специфически связывает HER2 или его фрагмент, и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 911-949 или 950. Также предложены белки, содержащие варианты (a)-(f), которые сохраняют способность специфически связывать свои соответствующие мишени. В некоторых вариантах осуществления DDpp слит с гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид содержит полноразмерное антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления DD слит с: аминоконцом тяжелой цепи полноразмерного антитела; аминоконцом легкой цепи полноразмерного антитела; карбоксильным концом тяжелой цепи полноразмерного антитела; или карбоксильным концом легкой цепи полноразмерного антитела. В других вариантах осуществления DD слит с фрагментом антитела, который представляет собой Fc. В дополнительных вариантах осуществления гетерологичный полипептид содержит член, выбранный из группы, состоящей из: (i) трансмембранного домена; (ii) мембраносвязывающего домена; (iii) человеческого сывороточного альбумина или его фрагмента; (iv) AFP или его фрагмента; (v) p26 AFP или его фрагмента; (vi) внеклеточного домена рецептора или его фрагмента; и (vii) внеклеточного домена внутриклеточного рецептора (например, ядерного белка) или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, который содержит внеклеточный домен, или фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8) или CD19 (SEQ ID NO: 3) или CS1 (SEQ ID NO: 965). В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, который содержит внеклеточный домен, или фрагмент внеклеточного домена рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96. В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, который содержит антигенную часть сывороточного белка (например, AFP и p26 AFP). В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, который содержит антигенную часть внутриклеточного белка (например, ядерного белка). В некоторых вариантах осуществления белок является меченым. В других вариантах осуществления метку выбирают из группы, состоящей из ферментативной метки, флуоресцентной метки, люминесцентной метки, биолюминесцентной метки и биотинового фрагмента. В дополнительных вариантах

осуществления белок является конъюгированным с терапевтическим или цитотоксическим агентом. В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, который связывается с одним или более главными комплексами гистосовместимости (ГКГС) класса I или класса II.

[0007] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфически связывает ВСМА. В некоторых вариантах осуществления DD специфически связывает белок ВСМА, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 7. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления связывающий ВСМА DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит несколько доменов связывания мишени (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые связывают ВСМА. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые имеют одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые связываются с различными эпитопами ВСМА. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает ВСМА и дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 дополнительных различных DD или доменов связывания мишени (например, scFv), которые связываются с ВСМА или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает ВСМА, и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности В-клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает ВСМА, и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток.

[0008] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый

белок, содержащий DD, который специфически связывает ВСМА. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который специфически связывает белок ВСМА, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело или часть (фрагмент) антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления DDpp содержит коммерчески одобренное терапевтическое антитело (например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, вельтузумаб, MEDI-551, эпратузумаб, белимумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN882). В других вариантах осуществления связывающий ВСМА DDpp представляет собой слитый белок Fc.

[0009] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит связывающий ВСМА DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит AFP или p26 AFP или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит AFP (например, SEQ ID NO: 9) или их фрагмента. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит p26 AFP (SEQ ID NO: 10) или их фрагмента.

[0010] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp представляет собой растворимый белок, содержащий один или более связывающих мишень DDpp и белок p29 (например, имеющий последовательность SEQ ID NO: 10, 968, 969, 970, 971, 972, 973 или 974). Было обнаружено, что такие слитые белки, содержащие последовательности p29, имеют удивительно длинный период полужизни в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления растворимый слитый белок DDpp имеет период полужизни в плазме *in vivo*, равный по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по

меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 32 часа, по меньшей мере 64 часа, или более. В некоторых вариантах осуществления растворимый слитый белок имеет период полужизни в плазме *in vivo*, равный по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 32 часа, по меньшей мере 64 часа, или более 65 часов, или 1-10 часов, 2-10 часов, 4-10 часов, 6-10 часов или 6-9 часов у мыши. В некоторых вариантах осуществления растворимый слитый белок DDpp имеет период полужизни в плазме *in vivo*, равный по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 32 часа, по меньшей мере 64 часа, или более 65 часов, или 1-10 часов, 2-10 часов, 4-10 часов, 6-10 часов или 6-9 часов у человека.

[0011] В некоторых вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен CD123 (SEQ ID NO: 8) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37, CS1, TSLPR, IL7R и gp96, или их фрагмента.

[0012] В дополнительных вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит фрагмент сывороточного белка (например, HSA, AFP и p26 AFP), внеклеточный домен рецептора (например, ВСМА, CD123, CS1 и CD19) или внутриклеточный белок (например, ядерный белок), состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков.

[0013] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфически связывает

CD123. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает белок CD123, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 8. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления связывающий CD123 DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит несколько доменов связывания мишени (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые связывают CD123. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые имеют одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые связываются с различными эпитопами CD123. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CD123 и дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 дополнительных различных DD или доменов связывания мишени (например, scFv), которые связываются с ВСМА или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CD123, и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности В-клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CD123, и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток.

[0014] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает CD123. В некоторых вариантах осуществления DD специфически связывает белок CD123, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления связывающий CD123

слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело или часть (фрагмент) антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления DDpp содержит коммерчески одобренное терапевтическое антитело (например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, вельтузумаб, MEDI-551, эспратузумаб, белилумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN8828). В других вариантах осуществления связывающий CD123 DDpp представляет собой слитый белок Fc.

[0015] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит связывающий CD123 DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит AFP или p26 AFP или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит AFP (например, SEQ ID NO: 9) или их фрагмента. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит p26 AFP (SEQ ID NO: 10) или их фрагмента.

[0016] В некоторых вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp связывающий CD123 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8) или их фрагмента. В других вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8) или CS1 (SEQ ID NO: 965) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37, CS1, TSLPR, IL7R и gp96, или их фрагмента.

[0017] В дополнительных вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp связывающий CD123 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740.

[0018] В некоторых вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит фрагмент сывороточного белка (например, HSA, AFP и p26 AFP), внеклеточный домен рецептора (например, BCMA, CS1, CD123 и CD19) или внутриклеточный белок (например, ядерный белок), состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков.

[0019] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфически связывает CS1. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает белок CS1, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 965. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления связывающий CS1 DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит несколько доменов связывания мишени (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые связывают CS1. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые имеют одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые связываются с различными эпитопами CS1. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CS1 и дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 дополнительных различных DD или доменов связывания мишени (например, scFv), которые связываются с BCMA или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CS1, и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности В-клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CS1, и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов

связывания мишени, связывающих один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток.

[0020] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает CS1. В некоторых вариантах осуществления DD специфически связывает белок CS1, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 965. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело или часть (фрагмент) антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления DDpp содержит коммерчески одобренное терапевтическое антитело (например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, вельтузумаб, MEDI-551, эпатузумаб, белилумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN8828). В других вариантах осуществления связывающий CS1 DDpp представляет собой слитый белок Fc.

[0021] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит связывающий CS1 DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит AFP или p26 AFP или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит AFP (например, SEQ ID NO: 9) или их фрагмента. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp

содержит p26 AFP (SEQ ID NO: 10) или их фрагмента.

[0022] В некоторых вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp связывающий CS1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен BCMA (SEQ ID NO: 7), CD123 (SEQ ID NO: 8) или CS1 (SEQ ID NO: 965) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37, CS-1, TSLPR, IL7R и gp96, или их фрагмента.

[0023] В дополнительных вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp связывающий CS1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910.

[0024] В некоторых вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит фрагмент сывороточного белка (например, HSA, AFP и p26 AFP), внеклеточный домен рецептора (например, BCMA, CS1, CD123 и CD19) или внутриклеточный белок (например, ядерный белок), состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков.

[0025] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфически связывает AFP или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает белок AFP, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 9, или его фрагмент. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит несколько доменов связывания мишени (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах

осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые связывают AFP, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые имеют одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые связываются с различными эпитопами AFP или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP или его фрагмент и дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 дополнительных различных DD или доменов связывания мишени (например, scFv), которые связываются с AFP, фрагментом AFP или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP или его фрагмент, и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности В-клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP, и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток.

[0026] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает AFP или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления DD специфически связывает белок AFP, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 9, или его фрагмент. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления связывающий AFP DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит связывающий AFP DD, функционально связанный с полноразмерным антителом или частью (фрагментом) антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления DDpp содержит коммерчески одобренное терапевтическое антитело

(например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, вельтузумаб, MEDI-551, эспратузумаб, белимумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN882). В некоторых вариантах осуществления связывающий AFP DDpp представляет собой слитый белок Fc.

[0027] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP или фрагмент AFP, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления связывающий AFP DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент.

[0028] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP или фрагмент AFP и дополнительно содержит внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления связывающий AFP DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8) или CS1 (SEQ ID NO: 965) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37, TSLPR, IL7R и gp96, или их фрагмента.

[0029] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP или фрагмент AFP и дополнительно содержит внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления связывающий AFP DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895.

[0030] В некоторых вариантах осуществления связывающий AFP слитый белок DDpp содержит фрагмент сывороточного белка (например, HSA), внеклеточный домен

рецептора (например, BCMA, CS1, CD123 и CD19) или внутриклеточный белок (например, ядерный белок), состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков.

[0031] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфически связывает p26 AFP. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает AFP p26, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 10, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления DD специфически связывает AFP p26, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 10, но специфически не связывает AFP, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит несколько доменов связывания мишени (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые связывают p26 AFP. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые имеют одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые связываются с различными эпитопами p26 AFP. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает p26 AFP и дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 дополнительных различных DD или доменов связывания мишени (например, scFv), которые связываются с p26 AFP или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает p26 AFP, и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности В-клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает p26 AFP, и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 раковых антигенов, экспрессируемых

на поверхности различных раковых клеток.

[0032] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает p26 AFP. В некоторых вариантах осуществления DD специфически связывает AFP p26, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp, связывающий p26 AFP, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления DD слитого белка DDpp специфически связывает p26 AFP, но специфически не связывает AFP, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 9. В других вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления связывающий p26 AFP DDpp представляет собой слитый белок Fc.

[0033] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который специфически связывает p26 AFP. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит связывающий p26 AFP DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp, связывающий p26 AFP, содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент.

[0034] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит связывающий p26 AFP DD и дополнительно содержит внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp, связывающий p26 AFP, содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления

слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен BCMA (SEQ ID NO: 7), CD123 (SEQ ID NO: 8) или CS1 (SEQ ID NO: 965) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37, TSLPR, IL7R и gp96, или их фрагмента.

[0035] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит связывающий p26 AFP DD и дополнительно содержит внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp, связывающий p26 AFP, содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp, связывающий p26 AFP, содержит фрагмент сывороточного белка (например, HSA), внеклеточный домен рецептора (например, BCMA, CS1, CD123 и CD19) или внутриклеточный белок (например, ядерный белок), состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков.

[0036] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфически связывает HER2. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает белок HER2, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 967. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления связывающий HER2 DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит несколько доменов связывания мишени (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые связывают HER2. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые имеют одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые связываются с различными эпитопами HER2. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает HER2 и дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 дополнительных различных DD или доменов связывания мишени (например, scFv), которые связываются с BCMA или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD,

который специфически связывает HER2, и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает HER2, и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток.

[0037] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает HER2. В некоторых вариантах осуществления DD специфически связывает белок HER2, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 967. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело или часть (фрагмент) антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления DDpp содержит коммерчески одобренное терапевтическое антитело. В других вариантах осуществления связывающий HER2 DDpp представляет собой слитый белок Fc.

[0038] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит связывающий HER2 DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент. В некоторых вариантах

осуществления слитый белок DDpp содержит AFP или p26 AFP или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит AFP (например, SEQ ID NO: 9) или их фрагмента. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит p26 AFP (SEQ ID NO: 10) или их фрагмента.

[0039] В некоторых вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp связывающий HER2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен BCMA (SEQ ID NO: 7), CD123 (SEQ ID NO: 8) или CS1 (SEQ ID NO: 965) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37, CS-1, TSLPR, IL7R и gp96, или их фрагмента.

[0040] В дополнительных вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp связывающий HER2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950.

[0041] В некоторых вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит фрагмент сывороточного белка (например, HSA, AFP и p26 AFP), внеклеточный домен рецептора (например, BCMA, CS1, CD123 и CD19) или внутриклеточный белок (например, ядерный белок), состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков.

[0042] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело. В других вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий полноразмерное антитело, которое специфически связывается с раковым антигеном. В других вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий полноразмерное антитело, причем антитело специфически связывается с раковым антигеном, предположительно экспрессируемым раком субъекта,

которому вводят слитый белок DDpp.

[0043] В некоторых вариантах осуществления раскрытый DDpp (например, слитый белок DDpp) является меченным. Метки, которые можно использовать для мечения DDpp, включают, но не ограничиваются ими, ферментную метку, флуоресцентную метку, люминесцентную метку и биолюминесцентную метку. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой биотиновый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой стрептавидиновый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой метку His или метку FLAG. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой люциферазу, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок или другой подобный агент.

[0044] В других вариантах осуществления слитый белок DDpp прикреплен к твердой подложке. В некоторых вариантах осуществления твердый носитель выбирают из группы, состоящей из гранулы, предметного стекла, чипа, желатина и агарозы.

[0045] В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, слитый белок DDpp) связан с липосомой. В некоторых вариантах осуществления DDpp связан с липосомой посредством ковалентного связывания. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок. В других вариантах осуществления DDpp представляет собой CAR. В дополнительных вариантах осуществления DDpp связан с липосомой посредством ионного связывания, но не ковалентного связывания.

[0046] В некоторых вариантах осуществления DDpp, связывающийся с мишенью, конъюгируют с терапевтическим или цитотоксическим агентом (например, химиотерапевтическим агентом или радиотерапевтическим агентом).

[0047] В дополнительных вариантах осуществления в данном изобретении предложен химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит домен связывания мишени, содержащий раскрытый в данном документе DD (например, DD, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-949 или 950). В некоторых вариантах осуществления DD связывает ВСМА и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления DD связывает CD123 и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления DD связывает AFP и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления DD связывает p26 AFP и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен

связывания мишени, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит трансмембранный домен 41BB или CD28. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, который выбирают из группы, состоящей из домена альфа-, бета- или дзета- цепи рецептора Т-клеток человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из: CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, антигена, связанного с функцией лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, который специфически связывается с CD83, и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит второй домен связывания мишени, имеющий ту же или другую мишень, что и домен связывания мишени на основе DD. В некоторых вариантах осуществления CAR экспрессируется в иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку (CAR Т-клетку) или клетку естественного киллера (NK) (CAR NK-клетку). В некоторых вариантах осуществления CAR связан с липосомой.

[0048] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит 2, 3, 4, 5 или более 5, DD и/или других связывающих доменов (например, scFv), которые специфически связывают представляющую интерес мишень (например, BCMA или CD123), экспрессируемую на поверхности раковой клетки. В дополнительных вариантах осуществления CAR содержит 2, 3, 4, 5 или более 5, DD или других связывающих доменов (например, scFv), которые специфически связывают вторую другую представляющую интерес мишень, экспрессируемую на поверхности раковой клетки. В дополнительных вариантах осуществления вводимый CAR дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5, DD или других связывающих доменов (например, scFv), которые специфически связывают вторую другую представляющую интерес мишень, экспрессируемую второй другой раковой клеткой или сосудистой эндотелиальной клеткой.

[0049] Также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие раскрытый DDpp (например, слитые белки DDpp). Дополнительно предложены векторы (например, плазмиды, вирусные векторы и невирусные векторы), содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие DDpp (например, слитые белки DDpp), и клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты и векторы. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность, которая регулирует экспрессию полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты. В дополнительных вариантах

осуществления вектор содержит последовательность индуцибельного промотора. В дополнительных вариантах осуществления вектор содержит один или более дополнительных стандартных компонентов для экспрессии белка, кодируемого нуклеиновой кислотой (например, промоторы, компоненты упаковки и т.д.). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой лентивирусный вектор.

[0050] В данном изобретении также предложены клетки-хозяева, которые содержат молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие связывающийся с мишенью DDpp, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева (например, клетки клеточной линии) сконструированы для экспрессии белка, содержащего описанный в данном документе DD, (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11–949 или 950). В некоторых вариантах осуществления экспрессия DDpp клетками-хозяевами позволяет продуцировать и выделять DDpp. В некоторых вариантах осуществления экспрессия приводит к тому, что DDpp экспрессируется на поверхности и/или интегрируется в мембрану клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой вирусную частицу или клетку бактерий, дрожжей, грибов или растений. В других вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В другом варианте осуществления клетка млекопитающего представляет собой иммунную клетку. В одном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой иммунную клетку человека. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка человека представляет собой Т-клетку. В других вариантах осуществления иммунная клетка человека представляет собой клетку естественного киллера (NK). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка человека отображает DDpp на своей клеточной поверхности.

[0051] В данном изобретении дополнительно предложена клетка-хозяин, экспрессирующая белок, содержащий DD, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий DD, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен связывания мишени, который содержит DD, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11-305 и 306; SEQ ID NO: 307-739 и 740; SEQ ID NO: 741-874 и 886-895; SEQ ID NO: 896-909 и 910 или SEQ ID NO: 911-949, и 950 и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит внутриклеточный домен (содержащий сигнальный домен). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка CAR представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка CAR представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная

клетка CAR не является Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой иммунную клетку, которая дополнительно содержит второй полипептид CAR, имеющий DD или другой связывающий домен (например, scFv), который специфически связывает ту же или другую мишень (например, другой эпитоп той же мишени), или вторую представляющую интерес мишень (например, экспрессируемую раковой клеткой) как первая CAR, экспрессируемая иммунной клеткой-хозяином.

[0052] Также предложены клетки млекопитающих, которые генерируют связанные с мембраной вирусоподобные частицы (VLP), причем клетка млекопитающего сконструирована так, чтобы экспрессировать слитый белок, содержащий полипептид домена D (DDpp), слитый с химерным антигенным рецептором (CAR), причем этот гибридный белок экспрессируется на сгенерированных VLP (например, в виде трансмембранных белков). В зависимости от вариантов осуществления VLP, продуцируемые клетками млекопитающих, пригодны для использования в качестве иммуногенов для создания антител.

[0053] Фармацевтические композиции, содержащие белок, содержащий описанный в данном документе DD, нуклеиновые кислоты, кодирующие белки, векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты и/или векторы. Как и наборы, содержащие один или более раскрытых DDpp, связывающихся с мишенью (например, слитые белки DDpp, такие как DD-Fc и DD-CAR), молекулы нуклеиновой кислоты, векторы и клетки-хозяева (например, терапевтический набор, диагностический набор, комплект для применения и т. д.).

[0054] DDpp, предложенные в данном документе, обладает активностями, которые включают, но не ограничиваются ими, способность специфически связывать представляющую интерес мишень (например, терапевтическую мишень и/или диагностическую мишень, такую как BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP и p26 AFP, пептидная метка и сывороточный белок, такой как альфа-фетопротейн, человеческий сывороточный альбумин (HSA) или иммуноглобулин) *in vitro* или *in vivo*, и способность служить в качестве реактивного сайта для связывания или ассоциации белка, такого как слитый белок DDpp, с одним или более дополнительными фрагментами (например, твердой подложки) и/или других модификаций. DDpp, предложенный в данном документе, также может обладать дополнительными желательными свойствами и/или функциональными возможностями, полезными в производстве, составлении рецептур и биологических, диагностических и терапевтических применениях.

[0055] В некоторых вариантах осуществления DDpp используется для связывания,

обнаружения и/или количественного определения представляющей интерес мишени (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP) в образце, содержащем мишень. В одном варианте осуществления в данном изобретении предложен способ обнаружения представляющей интерес мишени (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или AFP p26) в образце, включающий: (а) приведение в контакт образца с DDpp, содержащим DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-949 и 950, которые специфически связывают мишень в условиях, подходящих для специфического связывания DDpp с мишенью, для образования комплекса мишень/DDpp и (b) обнаружение присутствия комплекса и/или захваченной мишени. В некоторых вариантах осуществления DDpp иммобилизован на твердой подложке. В некоторых вариантах осуществления DD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 или 306, а DDpp используется для связывания, обнаружения и/или количественного определения BCMA или слитого белка, содержащего BCMA, в образце. В некоторых вариантах осуществления DD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 или 740, а DDpp используется для связывания, обнаружения и/или количественного определения CD123 или слитого белка, содержащего CD123, в образце. В некоторых вариантах осуществления DD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 или 886-895, а DDpp используется для связывания, обнаружения и/или количественного определения p26 AFP или слитого белка, содержащего p26 AFP, в образце. В некоторых вариантах осуществления DD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 или 910, а DDpp используется для связывания, обнаружения и/или количественного определения CS1 или слитого белка, содержащего CS1, в образце. В некоторых вариантах осуществления DD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 или 950, а DDpp используется для связывания, обнаружения и/или количественного определения HER2 или слитого белка, содержащего HER2, в образце.

[0056] Также предложен способ количественного определения представляющей интерес мишени (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP) в образце, содержащем мишень, включающий: (а) приведение в контакт образца с DDpp, содержащим DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-949 и 950, который специфически связывает мишень и который иммобилизован на твердой подложке, в условиях, подходящих для специфического связывания DDpp с мишенью, с образованием комплекса мишень/DDpp и

(b) обнаружение присутствия комплекса мишень/DDpp и/или захваченная мишень, причем количественное определение продукта указывает или может быть коррелировано с количеством мишени или слитого белка, содержащего мишень, в образце.

[0057] В дополнительных вариантах осуществления предложенные DDpp используют в аналитике белка. В некоторых вариантах осуществления DDpp конъюгированы с обнаруживаемым агентом и/или меткой. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306; SEQ ID NO: 307-739 и 740; SEQ ID NO: 741-874 и 886-895; SEQ ID NO: 896-909 и 910 или SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306; SEQ ID NO: 307-739 и 740 или SEQ ID NO: 741-874 и 886-895; SEQ ID NO: 896-909 и 910 или SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления DDpp конъюгирован с детектируемым агентом. В одном варианте осуществления детектируемый агент включает хромоген. В другом варианте осуществления детектируемый агент включает флуоресцентный краситель. В дополнительном варианте осуществления детектируемый агент включает радионуклид. В некоторых вариантах осуществления DDpp конъюгирован с детектируемым агентом посредством ковалентного связывания. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок. В дополнительных вариантах осуществления DDpp является мультимерным. В дополнительных вариантах осуществления DDpp конъюгирован с меткой. В некоторых вариантах осуществления метка является членом, выбранным из группы, состоящей из: полигистидильной метки, тус-метки и FLAG-метки. В других вариантах осуществления DDpp конъюгирован с комбинацией меток (например, полигистидильной меткой и FLAG-меткой). В некоторых вариантах осуществления DDpp конъюгирован с меткой (метками) посредством ковалентного связывания. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок. В некоторых вариантах осуществления DDpp является мультимерным.

[0058] В дополнительных вариантах осуществления DDpp конъюгирован с твердой подложкой или меткой. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой хроматографический шарик, смолу, предметное стекло, чип, желатин или агарозу.

[0059] Также предложены способы применения DDpp в диагностических и терапевтических применениях. В одном варианте осуществления в данном изобретении предложен способ лечения заболевания или расстройства, включающий введение

терапевтически эффективного количества DDpp (например, слитого белка DDpp), который специфически связывает представляющую интерес терапевтическую мишень (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP) нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой рак, В-клеточное злокачественное новообразование, заболевание или расстройство иммунной системы или инфекцию. Также предложены способы лечения заболевания или расстройства, которые включают совместное введение дополнительного терапевтического агента вместе с раскрытым DDpp. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой рак молочной железы или рак яичника.

[0060] Раскрытые в данном документе DDpp, связывающие мишень, имеют применения, которые включают диагностические и терапевтические применения. В некоторых вариантах осуществления DDpp являются пригодными в терапевтическом контексте, например, для лечения и/или диагностики заболевания, такого как рак (например, солидное или гематологическое злокачественное новообразование).

[0061] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий: введение субъекту терапевтически эффективного количества белка (т.е. DDpp), содержащего DD, раскрытый в данном документе (например, раскрытый в таблице 1, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-949 или 950); нуклеиновой кислоты, кодирующей белок; вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, или клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность DD, которая специфически связывает BCMA. В некоторых вариантах осуществления DD DDpp специфически связывает BCMA, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 7. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность DD, которая специфически связывает CD123. В некоторых вариантах осуществления DD DDpp специфически связывает CD123, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 8. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность DD, которая специфически связывает CS1. В некоторых вариантах

осуществления DD DDpp специфически связывает CS1, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 965. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность DD, которая специфически связывает HER2. В некоторых вариантах осуществления DD DDpp специфически связывает HER2, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 967. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность DD, которая специфически связывает AFP. В некоторых вариантах осуществления DD DDpp специфически связывает AFP, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 9. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает AFP p26, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 10. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления DD DDpp специфически связывает p26 AFP, но специфически не связывает AFP, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 9. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895.

[0062] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения субъекта, имеющего В-клеточное злокачественное новообразование, включающий: введение субъекту эффективного количества белка, содержащего DD, раскрытый в данном документе (например, раскрытый в таблице 1, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-949 или 950); нуклеиновой кислоты, кодирующей белок; вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, или клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из лимфомы (например, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы (НХЛ), лейкоза и миеломы. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из: острого лимфоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфомы из мантийных клеток и диффузной В-крупноклеточной лимфомы, плазмцитомы и множественной миеломы.

[0063] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий: введение субъекту иммунной клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит: домен связывания мишени, содержащий DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-949 и 950, причем полипептид специфически связывает представляющую интерес мишень и трансмембранный домен. В других вариантах осуществления представляющая интерес мишень экспрессируется раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления DD специфически связывает ВСМА, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 7. В других вариантах осуществления DD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления DD специфически связывает CD123, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 8. В других вариантах осуществления DD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления DD специфически связывает CS1, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 965. В других вариантах осуществления DD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления DD специфически связывает HER2, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 967. В других вариантах осуществления DD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления DD специфически связывает AFP p26, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 10. В других вариантах осуществления DD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный домен. В других вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, в котором при введении субъекту, имеющему рак, домен связывания мишени специфически связывается с представляющей интерес мишенью, экспрессируемой раковой клеткой (например, ВСМА и CD123), и при этом связывание представляющей интерес мишени индуцирует иммунную клетку для генерации цитотоксических сигналов, которые приводят к цитотоксическим эффектам на раковых клетках. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В других вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой НК-клетку. В некоторых вариантах осуществления

введенная иммунная клетка CAR не является Т-клеткой или НК-клеткой. В других вариантах осуществления субъекту вводят комбинацию различных типов иммунных клеток CAR (например, НК-клеток и Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления введение иммунной клетки является внутривенным. В некоторых вариантах осуществления комбинацию различных типов иммунных клеток CAR вводят субъекту внутривенно. В некоторых вариантах рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы или рак яичника.

[0064] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения субъекта, имеющего В-клеточное злокачественное новообразование, включающий: введение субъекту иммунной клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит: домен связывания мишени, содержащий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-949 и 950, причем полипептид специфически связывает представляющую интерес мишень, экспрессируемую раковой клеткой, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления домен связывания мишени специфически связывает ВСМА, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 7. В других вариантах осуществления домен связывания мишени содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления домен связывания мишени специфически связывает CD123, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 8. В других вариантах осуществления домен связывания мишени содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления домен связывания мишени специфически связывает CS1, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 965. В других вариантах осуществления домен связывания мишени содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный домен. В других вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, в котором при введении субъекту, имеющему рак, домен связывания мишени специфически связывается с представляющей интерес мишенью, экспрессируемой злокачественной В-клеткой (например, ВСМА, CS1 и CD123), и при этом связывание представляющей интерес мишени индуцирует иммунную клетку для генерации цитотоксических сигналов, которые приводят к цитотоксическим эффектам на злокачественных В-клетках рака. В некоторых вариантах осуществления В-

клеточное злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из лимфомы (например, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы (НХЛ), лейкоза и миеломы. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из: острого лимфоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфомы из мантийных клеток, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, плазмцитомы и множественной миеломы. В некоторых вариантах В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В других вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR не является Т-клеткой или NK-клеткой. В других вариантах осуществления субъекту вводят комбинацию различных типов иммунных клеток CAR (например, NK-клеток и Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления введение иммунной клетки является внутривенным. В некоторых вариантах осуществления комбинацию различных типов иммунных клеток CAR вводят субъекту внутривенно.

[0065] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения субъекта, имеющего связанное с В-клетками расстройство, включающий: введение субъекту эффективного количества белка, содержащего DD, раскрытый в данном документе (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, раскрытую в таблице 1, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-949 или 950); нуклеиновой кислоты, кодирующей белок; вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, или клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор.

[0066] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения субъекта, имеющего расстройство иммунной системы, включающий: введение субъекту эффективного количества белка, содержащего DD, раскрытый в данном документе (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, раскрытую в таблице 1, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-949 или 950); нуклеиновой кислоты, кодирующей белок; вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, или клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор. В некоторых вариантах осуществления расстройство иммунной системы представляет собой аутоиммунное заболевание, такое как ревматоидный артрит.

[0067] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложено применение композиции для лечения рака, причем композиция содержит: белок, содержащий DD, раскрытый в данном документе (например, DD, имеющий

аминокислотную последовательность, раскрытую в таблице 1, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-949 или 950); нуклеиновой кислоты, кодирующей белок; вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, или клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из лимфомы (например, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы (НХЛ), лейкоза и миеломы. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из: острого лимфоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфомы из мантийных клеток, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, плазмцитомы и множественной миеломы. В некоторых вариантах рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы или рак яичника.

[0068] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложено применение композиции для лечения В-клеточного злокачественного новообразования, причем композиция содержит: белок, содержащий DD, раскрытый в данном документе (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, раскрытую в таблице 1, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-949 или 950); нуклеиновой кислоты, кодирующей белок; вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, или клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из лимфомы (например, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы (НХЛ), лейкоза и миеломы. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из: острого лимфоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфомы из мантийных клеток, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, плазмцитомы и множественной миеломы. В некоторых вариантах В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому.

[0069] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложено применение композиции для лечения расстройства, связанного с В-клетками, причем композиция содержит: белок, содержащий DD, раскрытый в данном документе (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, раскрытую в таблице 1, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-949 или 950); нуклеиновой кислоты, кодирующей белок; вектор, содержащий нуклеиновую кислоту,

или клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор.

[0070] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложено применение композиции для лечения расстройства иммунной системы, причем композиция содержит: белок, содержащий DD, раскрытый в данном документе (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, раскрытую в таблице 1, или имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-949 или 950); нуклеиновой кислоты, кодирующей белок; вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, или клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор. В некоторых вариантах осуществления расстройство иммунной системы представляет собой аутоиммунное заболевание, такое как ревматоидный артрит.

[0071] В дополнительных вариантах осуществления в данном изобретении предложено применение иммунной клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), для лечения рака, причем CAR содержит: домен связывания мишени, содержащий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-949 и 950, при этом полипептид специфически связывает представляющую интерес мишень, экспрессируемую раковой клеткой, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, при этом внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, в котором при введении субъекту, имеющему рак, домен связывания мишени специфически связывается с представляющей интерес мишенью, экспрессируемой раковой клеткой, и при этом связывание представляющей интерес мишени индуцирует иммунную клетку для генерации цитотоксических сигналов, которые приводят к цитотоксическим эффектам на раковых клетках. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку или клетку естественного киллера (NK). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой клетку естественного киллера (NK). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка не является Т-клеткой или NK-клеткой. В других вариантах осуществления субъекту вводят комбинацию различных типов иммунных клеток CAR (например, Т-клеток и NK-клеток). В некоторых вариантах рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы или рак яичника.

[0072] В дополнительных вариантах осуществления в данном изобретении предложено применение иммунной клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), для лечения В-клеточного злокачественного новообразования, причем CAR содержит: домен связывания мишени, содержащий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:

11-949 или 950, при этом полипептид специфически связывает представляющую интерес мишень (например, мишень, экспрессируемую злокачественной В-клеткой, такой как ВСМА, CS1 или CD123, при этом домен связывания мишени содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-306, 307-740 и 896-910), трансмембранный домен и внутриклеточный домен, при этом внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, в котором при введении субъекту, имеющему рак, домен связывания мишени специфически связывается с представляющей интерес мишенью, экспрессируемой В-клеткой злокачественного новообразования, и при этом связывание представляющей интерес мишени индуцирует иммунную клетку для генерации цитотоксических сигналов, которые приводят к цитотоксическим эффектам на В-клетках злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку или клетку естественного киллера (NK). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой клетку естественного киллера (NK). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка не является Т-клеткой или NK-клеткой. В других вариантах осуществления субъекту вводят комбинацию различных типов иммунных клеток CAR (например, Т-клеток и NK-клеток). В некоторых вариантах В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому.

[0073] В дополнительных вариантах осуществления в данном изобретении предложено применение иммунной клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), для лечения расстройства иммунной системы, причем CAR содержит: домен связывания мишени, содержащий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-949 и 950, при этом полипептид специфически связывает представляющую интерес мишень, экспрессируемую иммунной клеткой, подлежащей лечению, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, при этом внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, в котором при введении субъекту, имеющему расстройство иммунной системы, домен связывания мишени специфически связывается с представляющей интерес мишенью, экспрессируемой иммунной клеткой-мишенью, и при этом связывание представляющей интерес мишени индуцирует рекомбинантную иммунную клетку для генерации цитотоксических сигналов, которые приводят к цитотоксическим эффектам на иммунных клетках-мишенях. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку или клетку естественного киллера (NK). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка не является Т-клеткой или NK-клеткой. В некоторых

вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой клетку естественного киллера (NK). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка не является Т-клеткой или NK-клеткой. В других вариантах осуществления субъекту вводят комбинацию различных типов иммунных клеток CAR (например, Т-клеток и NK-клеток).

[0074] Способы, кратко изложенные выше и/или изложенные в данном документе, описывают определенные действия, предпринимаемые практикующим врачом; однако следует понимать, что они могут также включать указание этих действий другой стороной. Таким образом, такие действия, как «введение Т-клетки, содержащей специфически связывающий мишень полипептид-CAR», включают «инструкцию по введению Т-клетки, содержащей специфически связывающий мишень полипептид-CAR».

[0075] В некоторых вариантах осуществления в данном раскрытии предложено:

Gg

[1.] Белок, содержащий домен связывания мишени на основе домена D (DD), причем DD представляет собой член, выбранный из группы, состоящей из:

(a) DD, который специфически связывает BCMA и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-305 или 306;

(b) DD, который специфически связывает CD123 и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 307-739 или 740;

(c) DD, который специфически связывает AFP и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 741-874 или 886-895;

(d) DD, который специфически связывает p26 AFP и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 741-874 или 886-895;

(e) DD, который специфически связывает CS1 и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 896-909 или 910; и

(f) DD, который специфически связывает HER2 и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 911-949 или 950;

[2.] белок по [1], в котором DD слит с гетерологичным полипептидом.

[3.] белок по [2], в котором гетерологичный полипептид содержит полноразмерное антитело или фрагмент антитела.

[4.] белок по [2], в котором гетерологичный полипептид содержит член, выбранный из группы, состоящей из

(a) трансмембранного домена;

(b) ассоциированного с мембраной домена;

(c) сывороточного альбумина человека или его фрагмента;

(d) AFP или его фрагмента;

- (e) p26 AFP или его фрагмента; и
- (f) внеклеточного домена рецептора или его фрагмента;

[5.] белок по [3], в котором DD слит с: аминоконцом тяжелой цепи полноразмерного антитела; аминоконцом легкой цепи полноразмерного антитела; карбоксильным концом тяжелой цепи полноразмерного антитела; или карбоксильным концом легкой цепи полноразмерного антитела;

[6.] белок по [3], в котором гетерологичный полипептид представляет собой Fc;

[7.] белок по [2], в котором гетерологичный полипептид содержит внеклеточный домен или фрагмент внеклеточного домена рецептора, выбранного из группы, состоящей из: BCMA, CD123, CS1 и CD19;

[8.] белок по любому из [1]-[7], который является меченым;

[9.] белок по [8], в котором метку выбирают из группы, состоящей из ферментативной метки, флуоресцентной метки, люминесцентной метки, биолюминесцентной метки и биотинового фрагмента;

[10.] белок по любому из [1]-[10], который конъюгирован с терапевтическим или цитотоксическим агентом;

[11.] химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит домен связывания мишени, содержащий белок по любому из [1]-[5];

[12.] CAR по [11], который содержит домен связывания мишени, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен;

[13.] CAR по [11] или [12], в котором трансмембранный домен содержит трансмембранный домен 41BB или CD28;

[14.] CAR по любому из [11]-[13], в котором внутриклеточный сигнальный домен выбирают из группы, состоящей из домена альфа-, бета- или дзета- цепи рецептора T-клеток человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека и любой их комбинации;

[15.] CAR по [11]-[14], в котором внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, антигена, связанного с функцией лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, лиганда, который специфически связывается с CD83, и любой их комбинации;

[16.] белок по любому из [1]-[15], который дополнительно содержит второй домен связывания мишени, имеющий ту же или другую мишень, что и домен связывания мишени на основе DD;

[17.] выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая белок по любому из [1]-[16];

[18.] вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по [17];

[19.] вектор по [18], в котором нуклеиновая кислота функционально связана с нуклеотидной последовательностью, которая регулирует экспрессию белка, кодируемого нуклеиновой кислотой;

[20.] вектор по [19], который представляет собой лентивирусный вектор;

[21.] клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по [17] или вектор по любому из [18-21];

[22.] клетка, сконструированная для экспрессии белка по любому из [1]-[16];

[23.] клетка по [21] или [22], в которой клетка представляет собой Т-клетку или естественную клетку-киллера (NK);

[24.] фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из [1]-[16], нуклеиновую кислоту по [17], вектор по [18], [19] или [20], или клетку по любому из [21]-[23];

[25.] набор, содержащий белок по любому из [1]-[16];

[26.] способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий:

введение субъекту эффективного количества белка по любому из [1]-[16], нуклеиновой кислоты по [17], вектора по [18], [19] или [20], клетки по любому из [21]-[23] или фармацевтической композиции по [24];

[27.] способ по [26], в котором рак представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование, выбранное из группы, состоящей из лимфомы (например, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы (НХЛ), лейкоза, плазмоцитомы и миеломы;

[28.] способ по [27], в котором В-клеточное злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из: хронического лимфоцитарного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфомы из мантийных клеток и диффузной В-крупноклеточной лимфомы, плазмоцитомы и множественной миеломы;

[27.] способ по [26], в котором рак представляет собой миелоидное злокачественное новообразование, выбранное из группы, состоящей из: хронического миелоидного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, лейкоза, плазмоцитомы и миеломы;

[29.] способ лечения субъекта, имеющего расстройство, связанное с В-клетками (например, моноклональную гаммапатию определенного значения), (MGUS)), включающий: введение субъекту эффективного количества белка по любому из [1]-[16], нуклеиновой кислоты по [17], вектора по [18], [19] или [20], клетки по любому из [21]-[23], или фармацевтической композиции по [24];

[30.] способ лечения субъекта, имеющего расстройство иммунной системы, включающий: введение субъекту эффективного количества белка по любому из [1]-[16],

нуклеиновой кислоты по [17], вектора по [18], [19] или [20], клетки по любому из [21]-[23], или фармацевтической композиции по [24];

[31.] способ по [30], в котором расстройство иммунной системы представляет собой аутоиммунное заболевание, такое как ревматоидный артрит;

[32.] способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий:

введение субъекту иммунной клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит: домен связывания мишени, содержащий DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-949 и 950, необязательно, при этом DD специфически связывает представляющую интерес мишень, экспрессируемую раковой клеткой;

трансмембранный домен и внутриклеточный домен; причем внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, и при этом после введения субъекту домен связывания мишени специфически связывается с представляющей интерес мишенью, экспрессируемой раковой клеткой, и

при этом связывание представляющей интерес мишени индуцирует иммунную клетку для создания цитотоксических сигналов, которые приводят к цитотоксическим эффектам на раковой клетке;

[33.] способ по [32], в котором иммунная клетка представляет собой Т-клетку;

[34.] способ по [32], в котором иммунная клетка представляет собой НК-клетку;

[35.] способ по [32], в котором введение является внутривенным;

[36.] применение композиции для лечения рака, причем композиция содержит белок по любому из [1]-[16], нуклеиновую кислоту по [17], вектор по [18], [19] или [20], или клетку по любому из [21]-[23];

[37.] применение по [36], в котором рак представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование;

[38.] применение по [37], в котором В-клеточное злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из лимфомы (например, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы (НХЛ), лейкоза и миеломы;

[39.] применение по [38], в котором В-клеточное злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из: хронического лимфоцитарного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфомы из мантийных клеток и диффузной В-крупноклеточной лимфомы;

[40.] применение композиции для лечения расстройства, связанного с В-клетками, в котором композиция содержит белок по любому из [1]-[16], нуклеиновую кислоту по [17], вектор по [18], [19] или [20], клетку по любому из [21]-[23], или

фармацевтическую композицию по [24]

[41.] применение композиции для лечения расстройства иммунной системы, в котором композиция содержит белок по любому из [1]-[16], нуклеиновую кислоту по [17], вектор по [18], [19] или [20], клетку по любому из [21]-[23], или фармацевтическую композицию по [24]

[42.] применение по [41], в котором расстройство иммунной системы представляет собой аутоиммунное заболевание, такое как ревматоидный артрит;

[43.] применение иммунной клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR) для лечения рака, причем CAR содержит: домен связывания мишени, содержащий DD, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-949 или 950, и, необязательно, при этом домен связывания мишени специфически связывает представляющую интерес мишень, экспрессируемую раковой клеткой,

трансмембранный домен и внутриклеточный домен; причем внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, при этом после введения субъекту, имеющему рак, домен связывания мишени специфически связывается с представляющей интерес мишенью, экспрессируемой раковой клеткой, и

при этом связывание представляющей интерес мишени индуцирует иммунную клетку для создания цитотоксических сигналов, которые приводят к цитотоксическим эффектам на раковой клетке;

[44.] применение по [43], в котором иммунная клетка представляет собой Т-клетку или естественную клетку-киллера (NK).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0076] На Фиг. 1A-1B, DDpp придают новые специфичности связывания другой молекуле (например, полноразмерному антителу) как части слитого белка (например, слитого белка антитело-DDpp). Слитые DDpp-антитела были созданы с использованием RSV-специфичного антитела (SYN) и любого пептида без мишени SEQ ID NO: 1 (DD) или CD137-специфичный DDpp (bb10) (SEQ ID NO: 876). DDpp слиты с N-концом (bb10-SYN и DD-SYN) или с C-концом (SYN-bb10 и SYN-DD). Все четыре слитых антитела связываются с RSV (Фиг. 1A). Однако bb10 слитый с N-концом (bb10-SYN) или C-концом (SYN-bb10) тяжелой цепи антитела придает новую специфичность связывания CD137 с моноспецифичным антителом (Фиг. 1B).

[0077] На Фиг. 2A-2F. Т-клетки CD123-DDpp-CAR продуцируют цитокины в ответ на связывание с мишенью. На Фиг. На Фиг.2A и 2B показаны данные, связанные с

продукцией гамма-интерферона ($IFN\gamma$) Т-клетками, экспрессирующими CD123-DDpp-CAR, при совместном культивировании с CD123-негативной опухолью K562 и CD123-позитивной опухолью BDCM, соответственно. На Фиг. 2С и 2D представлены аналогичные данные, измеряющие продукцию интерлейкина-2 (IL2) Т-клетками CD123-DDpp-CAR при совместном культивировании с K562 и BDCM соответственно. На Фиг. 2Е и 2F представлен сходный управляемый мишенью цитокин ($IFN\gamma$, IL2) Т-клетками PD-L1-DDppCAR при совместном культивировании с опухолевыми клетками, экспрессирующими PDL1 (SUDHL-1).

[0078] На Фиг. 3А-3В. Т-клетки, экспрессирующие DDpp-CAR, не подвергаются чрезмерному истощению в большей степени, чем scFv. На Фиг. 3А представлена экспрессия трех маркеров истощения (LAG3, PD1 и TIM3) на Т-клетках, экспрессирующих различные DDpp-CAR, при сходных уровнях экспрессии этих маркеров на scFv-CAR 32716 (32716 (Du X1, Ho M, Pastan I. 2007. Новые иммунотоксины, нацелены на CD123 - антиген стволовых клеток на клетках острого миелоидного лейкоза. *J Immunother.* 30(6): 607–13). На Фиг. 3В показаны данные проточной цитометрии, демонстрирующие сходную экспрессию маркера истощения на Т-клетках DDpp-CAR (экспрессирующих CD123, нацеленную на cg06 DDpp) по сравнению с Т-клеткой CAR, экспрессирующей CD123-специфичный scFv (32716).

[0079] На Фиг. 4А-4С. Т-клетки, экспрессирующие DDpp-CAR (CD123-нацеленные), подвергаются дегрануляции при совместном культивировании с экспрессирующими мишень опухолевыми клетками (BDCM). На Фиг.4А-4С показаны результаты, полученные при культивировании Т-клеток отдельно (Фиг. 4А) или в присутствии клеток K562 (Фиг. 4В) или BDCM (Фиг. 4С).

[0080] На Фиг. 5А-5D. Т-клетки, экспрессирующие DDpp-CAR, опосредуют специфичную для мишени цитотоксичность опухоли. На Фиг. 5А показаны данные, относящиеся к проценту уничтожения CD123-DDpp-CAR Т-клеток опухолевых клеток K562, которые являются негативными в отношении CD123. На Фиг. 5В показан процент уничтожения, когда нацеленные на CD123 DDpp-CAR Т-клетки, совместно культивируют с CD123-позитивными клетками BDCM. Данные из Фиг. 5А и 5В были получены с использованием Т-клеток из первого образца донорской крови. На Фиг. 5С и 5D показаны аналогичные данные для Т-клеток, собранных у второго донора.

[0081] На Фиг. 6А-6Е. показаны биспецифичные DDpp-CAR Т-клетки. На Фиг. 6А показан процент Т-клеток, экспрессирующих нацеленные на CD123 DDpp-CAR (cg06). На Фиг. 6В показан процент Т-клеток, экспрессирующих нацеленные на PDL1 DDpp-CAR (pb04). На Фиг. 6С показан процент Т-клеток, экспрессирующих биспецифичные

нацеленные на CD123-PDL1 DDpp-CAR (экспрессируемые с cg06 DDpp, дистальным к мембране Т-клеток, по сравнению с pb04 DDpp). На Фиг. 6D показан процент Т-клеток, экспрессирующих биспецифичные нацеленные на PDL1-CD123 DDpp-CAR (экспрессируемые с pb04 DDpp, дистальным к мембране Т-клеток, по сравнению с cg06 DDpp). На Фиг. 6E представлены данные, относящиеся к повышенному внутриклеточному сигналингу биспецифичного DDpp.

[0082] На Фиг. 7A и 7B показано, что двойные адаптеры связывающих доменов управляют усилением сигналинга репортерных клеток Jurkat NFAT-люцифераза, экспрессирующих CAR, по сравнению с единичными адаптерами связывающих доменов. На Фиг. 7A, 50000 репортерных клеток, ранее трансдуцированных AFP (p26)-связывающим CAR (af03), культивировали в течение 5 часов в присутствии CD123-специфического Cg06-адаптера (Cg06-p26) или Cg06-двойного адаптерного белка (Cg06-p26-Cg06) в присутствии 50000 CD123⁺ MOLM13 или CD123-дефицитных клеток MOLM13, затем оценивали на активность люциферазы. CD123-дефицитные клетки создавали с использованием технологии генной инженерии CRISPR/Cas9. На Фиг. 7B, 50000 репортерных клеток, ранее трансдуцированных AFP (домен p26)-связывающим CAR (af03), культивировали в течение 5 часов в присутствии ВСМА-специфического Bc40-адаптера (Bc40-p26) или двойного Bc40-адаптера (Bc40-p26-Bc40) в присутствии или в отсутствие клеток 50000 ВСМА⁺ U266, затем оценивали на активность люциферазы.

[0083] На Фиг. 8. нацеленный на ВСМА DDpp-CAR, содержащий DDpp bc40 (SEQ-ID NO: 164) уничтожает опухоль U226, экспрессирующую ВСМА, в мышинной модели В-клеточного рака.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0084] Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны ни в коей мере рассматриваться как ограничивающие заявленный предмет.

Определение терминов

[0085] Следует понимать, что в тех случаях, когда варианты осуществления описаны в данном документе с формулировкой «содержащий», в противном случае также предложены аналогичные варианты осуществления, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий в основном из». Однако при использовании в формуле изобретения в качестве переходных фраз, каждая из них должна интерпретироваться отдельно и в соответствующем юридическом и фактическом контексте (например, «содержащий» считается более открытой фразой, тогда как «состоящий из» является более

исключительным и «состоящим по существу из» является переходной формой).

[0086] В контексте данного документа, слова в единственном числе означают также и множественное число, если не указано иное.

[0087] Термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В», предназначен для включения как А, так и В; А или В; А (отдельно) и В (отдельно). Аналогично, термин «и/или», используемый в фразе, такой как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих вариантов осуществления: А, В, и С; А, В, или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

[0088] Термины «белок» и «полипептид» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения биологического полимера, содержащего звенья, полученные из аминокислот, связанных через пептидные связи; белок может состоять из двух или более полипептидных цепей.

[0089] Термины «антитело» или «иммуноглобулин», используемые в данном документе взаимозаменяемо, включают полноразмерные антитела и фрагменты антител, включая любой функциональный домен антитела, такой как антигенсвязывающий фрагмент или его отдельные цепи, эффекторный домен, эпитоп, эпитоп связывания рецептора реутилизации или его часть. Типичное антитело содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (в данном документе сокращенно называемой VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов – CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (в данном документе сокращенно называемой VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена – C1. Области VH и VL могут быть дополнительно поделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FW). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FW, расположенных от amino-конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител Рак опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Примеры антител по данному изобретению включают типичные антитела, scFv и их комбинации, в которых, например,

DDpp ковалентно связан (например, через пептидные связи или через химический линкер) с N-концом тяжелой цепи и/или легкой цепи типичного цельного (полноразмерного) антитела, или интеркалирован в H-цепь и/или L-цепь полноразмерного антитела.

[0090] Термин «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела и относится к любому функциональному домену антитела, такому как антигенсвязывающий фрагмент или его отдельные цепи, эффекторный домен или его часть и эпитоп, связывающий рецептор спасения, или его часть. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и F_v, линейные антитела, одноцепочечные антитела и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. Используемый в данном документе термин «фрагмент антитела» включает антигенсвязывающий сайт или эпитоп-связывающий сайт. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp содержит эффекторный домен или его часть. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp содержит эпитоп, связывающий рецептор спасения, или его часть.

[0091] Используемый в данном документе термин «область Fc» или просто «Fc» означает карбоксильную концевую часть константной области цепи иммуноглобулина, предпочтительно константную область тяжелой цепи иммуноглобулина или ее часть. Например, область Fc иммуноглобулина может содержать (1) домен CH₁, домен CH₂ и домен CH₃, (2) домен CH₁ и домен CH₂, (3) домен CH₁ и домен CH₃, 4) домен CH₂ и домен CH₃ или (5) комбинацию двух или более доменов и шарнирной области иммуноглобулина. Таким образом, в различных вариантах осуществления Fc относится к двум последним константным областям иммуноглобулиновых доменов IgA, IgD и IgG и к последним трем константным областям иммуноглобулиновых доменов IgE и IgM, а также к гибкому шарнирному N-концу этих доменов. Для IgA и IgM Fc может содержать J-цепь. Для IgG Fc содержит домены иммуноглобулина C γ 2 и C γ 3 и шарнир между C γ 1 и C γ 2. В предпочтительном варианте осуществления область Fc иммуноглобулина содержит по меньшей мере шарнирную область иммуноглобулина, домен CH₂ и домен CH₃, и предпочтительно при этом отсутствует домен CH₁. В одном варианте осуществления класс иммуноглобулина, из которого получена константная область тяжелой цепи, представляет собой IgG (Ig γ) (подклассы 1, 2, 3 или 4 γ). Можно использовать другие классы иммуноглобулина IgA (Ig α), IgD (Ig δ), IgE (Ig ϵ) и IgM (Ig μ). Хотя границы области Fc могут варьировать, область Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как содержащая остатки C226 или p260 до его карбоксильного конца, где нумерация соответствует индексу EU, как указано в Kabat. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NIH, Bethesda, Md. (1991)). Fc может

относиться к данной области в отдельности или к данной области в контексте полноразмерного антитела, фрагмента антитела или слитого белка Fc. Полиморфизмы наблюдались в ряде различных положений Fc, включая, но не ограничиваясь ими, положения 270, 272, 312, 315, 356 и 358, пронумерованные индексом EU, и, таким образом могут существовать небольшие различия между представленной последовательностью и последовательностями в предшествующем уровне техники. Выбор подходящей константной области тяжелой цепи иммуноглобулина подробно обсуждается в патенте США № 5541087 и 5726044, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Считается, что выбор конкретных последовательностей константных областей тяжелой цепи иммуноглобулина из определенных классов и подклассов иммуноглобулина для достижения конкретного результата, находится в пределах квалификации специалиста в данной области. Часть ДНК-конструкции, кодирующей Fc-область иммуноглобулина, предпочтительно содержит по меньшей мере часть шарнирного домена и, предпочтительно по меньшей мере часть СН3-домена Fc-гамма или гомологичных доменов в любом из IgA, IgD, IgE или IgM. Кроме того, предполагается, что замена или делеция аминокислот в константных областях тяжелой цепи иммуноглобулина могут быть пригодны при осуществлении способов и композиций, раскрытых в данном документе. Одним из примеров может быть введение аминокислотных замен в верхней области СН2 для создания варианта Fc с пониженной аффинностью к рецепторам Fc (Cole, J. Immunol. 159: 3613 (1997)).

[0092] «Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или АЗКЦ соответствуют опосредованной клетками реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют рецепторы Fc (FcR) (например, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на целевой клетке и, таким образом, приводят к лизису (или другому цитотоксическому эффекту) клетки-мишени. Для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы может быть проведен любой анализ АЗКЦ *in vitro*, описанный в патентах США № 5500362 или 5821337. Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают, без ограничения, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и естественные клетки-киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнения, АЗКЦ-активность молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, например, согласно описанию в публикации Clynes et al. PNAS 95: 652-656 (1998).

[0093] Используемые в данном документе термины «одноцепочечный переменный фрагмент(ы)» или «scFv» относятся к формам антител (например,

фрагментам антител), содержащим вариабельные области только тяжелых и легких цепей, соединенных линкерным пептидом. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp содержит DDpp и scFv.

[0094] Термин «линкер» относится к пептиду или другой химической связи, расположенной между DDpp и другим полипептидом слитого белка DDpp. Подходящие линкеры для связывания двух или более связанных DDpp будут понятны специалистам в данной области техники, а неограничивающие примеры описаны в данном документе.

[0095] Термин «функционально связанный», используемый в данном документе, указывает, что две молекулы присоединены так, что каждая из них сохраняет по меньшей мере некоторый уровень функциональной активности, который была у каждой молекулы в отдельности (при условии, что каждая молекула имела функциональную активность). В вариантах осуществления, когда одна молекула была лишена функциональной активности, она функционально связана с другой молекулой, если другая молекула сохраняет по меньшей мере некоторый уровень своей функциональной активности. Функционально связанный также может относиться к связыванию двух нефункциональных молекул. Две молекулы могут быть «функционально связаны» независимо от того, присоединены они прямо или косвенно (например, через линкер).

[0096] Термины «специфически связывает» или «обладающие селективной аффинностью к», «связывает», связывание используются взаимозаменяемо для обозначения того, что связывающий агент, такой как DDpp, реагирует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью, с большей аффинностью или с некоторой комбинацией вышеуказанного к эпитопу, белку или молекуле-мишени, чем с альтернативными веществами, включая белки, не связанные с эпитопом, белком или молекулой-мишенью. Из-за идентичности последовательностей между гомологичными белками у разных видов специфическое связывание в некоторых вариантах может включать связывающий агент, который распознает белок или мишень у более чем одного вида. Аналогично, из-за гомологии внутри определенных областей полипептидных последовательностей различных белков специфическое связывание может включать связывающий агент, который распознает более одного белка или мишени. Понятно, что в некоторых вариантах осуществления связывающий агент, который специфически связывает первую мишень, может специфически связывать или не связывать вторую мишень. Как таковое, «специфическое связывание» не обязательно требует (хотя может включать в себя) исключительное связывание, например, связывание с одной мишенью. Таким образом, связывающий агент может, в определенных вариантах осуществления, специфически связывать более чем одну мишень. В некоторых вариантах осуществления

множественные мишени могут быть связаны одним и тем же антигенсвязывающим сайтом на связывающем агенте.

[0097] «Мишень» относится к любой молекуле или комбинации молекул, которые могут быть связаны DDpp, таким как слитый белок DDpp, или другим компонентом слитого белка DDpp, таким как антитело или фрагмент варибельного домена антитела.

[0098] Термины «эпитоп» и «антигенная детерминанта» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к данной части любой молекулы (например, представляющей интерес мишени, такой как ВСМА, CD123, AFP или р26 AFP), способной распознаваться и специфически связываться конкретным связующим агентом (например, DDpp или антителом). Когда распознанная молекула представляет собой полипептид, эпитопы могут быть образованы из смежных аминокислот и несмежных аминокислот и/или других химически активных поверхностных групп молекул (таких как углеводы), расположенных рядом при образовании третичной структуры белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при денатурации белка, тогда как эпитопы, образованные третичной структурой, как правило, теряются при денатурации белка. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3 аминокислот и более, обычно, по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

[0099] «Пептидная метка» в контексте данного документа относится к пептидной последовательности, которая является частью или присоединена (например, посредством генной инженерии) к другому белку, чтобы обеспечить функцию результирующего слияния. Пептидные метки обычно относительно короткие по сравнению с белком, с которым они слиты; в качестве примера, пептидные метки, в некоторых вариантах осуществления, имеют длину четыре или более аминокислот, такую как 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25, или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, который содержит пептидную метку. В других вариантах осуществления DDpp специфически связывает пептидную метку. В данной области техники известны многочисленные пептидные метки, которые используются в соответствии с данным изобретением. Примеры пептидных меток, которые могут быть компонентом слитого белка DDpp или мишени, связанной с DDpp (например, слитого белка DDpp), включают, но не ограничиваются ими, HA (гемагглютинин), с-мус, гликопротеин D вируса простого герпеса (gD), T7, GST, GFP, MBP, Strep-метки, His-метки, Мус-метки, ТАР-метки и метка FLAG® (Eastman Kodak, Рочестер, штат Нью-Йорк) Аналогично, антитела к эпитопу-метке позволяют обнаруживать и локализовать слитый белок с использованием методов, известных в данной области техники, таких как

анализы вестерн-блот, ИФА и иммуноокрашивание клеток.

[00100] Термин «встречающийся в природе», используемый в связи с биологическими материалами, такими как молекулы нуклеиновой кислоты, полипептиды и клетки-хозяева, относится к тем, которые встречаются в природе и не являются модифицированными человеком. И наоборот, термины «не встречающийся в природе» или «синтетический» используемые в связи с биологическими материалами, относятся к тем материалам, которые не встречаются в природе и были изменены человеком.

[0100] Используемые в данном документе «модификации» в отношении эталонной последовательности включают замены, делеции, вставки и/или добавления последовательности соответствующего аминокислотного положения эталонной последовательности (например, DD, раскрытый в данном документе).

[0101] «Замена» в отношении эталонной последовательности относится к замене конкретного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком в соответствующем аминокислотном положении эталонной последовательности.

[0102] «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой консервативную аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, определены в данной области техники, и включают остатки с основными боковыми цепями (например, лизин (K), аргинин (R), гистидин (H)), остатки с кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E)), остатки с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин (G), аспарагин (N), глутамин (Q), серин (S), треонин (T), тирозин (Y), цистеин (C)), остатки с неполярными боковыми цепями (например, аланин (A), валин (V), лейцин (L), изолейцин (I), пролин (P), фенилаланин (F), метионин (M), триптофан (W)), остатки с бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин (T), валин (V), изолейцин (I)) и остатки с ароматическими боковыми цепями (например, тирозин (Y), фенилаланин (F), триптофан (W), гистидин (H)). Например, замещение фенилаланина на тирозин представляет собой консервативную замену. В конкретных вариантах осуществления консервативные замены в последовательностях DDpp приводят к измененному или неизменному специфическому связыванию DDpp, содержащего замену, с представляющей интерес мишенью (например, ВСМА, CD123, AFP или p26 AFP), с которой он связывается. В одном варианте осуществления консервативные замены в последовательностях DDpp не отменяют связывание DDpp, содержащего замену, с представляющей интерес мишенью, с которой он связывается. Способы идентификации нуклеотидных и аминокислотных

консервативных замен и неконсервативных замен, которые придают, изменяют или поддерживают селективную аффинность связывания, известны в данной области техники (см., например, Brummell, *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi, *Protein Eng.* 12(10): 879-884 (1999) и Burks, *PNAS* 94: 412-417 (1997)).

[0103] «Неконсервативная аминокислотная замена» представляет собой консервативную аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим несходную боковую цепь. В одном варианте осуществления неконсервативные замены в последовательностях DDpp приводят к специфическому связыванию DDpp, содержащего замену, с представляющей интерес мишенью (например, BCMA, CD123, AFP или p26 AFP), с которой он связывается. В одном варианте осуществления неконсервативные замены в последовательностях DDpp не отменяют связывание DDpp, содержащего замену, с представляющей интерес мишенью, с которой он связывается.

[0104] Термины «не встречающиеся в природе аминокислоты», «аналоги аминокислот» и «нестандартные аминокислотные остатки» используются в данном документе взаимозаменяемо. Не встречающиеся в природе аминокислоты, которые могут быть замещены в DDpp, предложенные в данном документе, известны в данной области техники. В одном варианте осуществления не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой 4-гидроксипролин, который может заменить пролин; 5-гидроксилизин, который может заменить лизин; 3-метилгистидин, который может заменить гистидин; гомосерин, который может заменить серин; и орнитин, который может заменить лизин. Дополнительные примеры не встречающихся в природе аминокислот, которые могут быть замещены в DDpp, включают, но не ограничиваются ими, такие молекулы, как: D-изомеры обычных аминокислот, 2,4-диаминомасляная кислота, альфа-аминоизомасляная кислота, A-аминомасляная кислота, Abu, 2-аминомасляная кислота, гамма-Abu, эпсилон-Ahx, 6-амино-гексановая кислота, Aib, 2-аминоизомасляная кислота, 3-амино-пропионовая кислота, орнитин, норлейцин, норвалин, гидроксипролин, саркозин, цитруллин, гомоцитруллин, цистеиновая кислота, трет-бутилглицин, трет-бутилаланин, фенилглицин, циклогексилаланин, бета-аланин, лантионин, дегидроаланин, γ -аминомасляная кислота, селеноцистеин и пирролизин, фтораминокислоты, аминокислоты-конструктор, такие как мета-бета-аминокислоты C-альфа-метиламинокислоты и N-альфа-метиламинокислоты или комбинации не встречающихся в природе аминокислот. Дополнительные не встречающиеся в природе аминокислоты могут включать, например, 4-амино-масляную кислоту, 4-амино-3-гидрокси-5-фенилпентановую кислоту, 4-амино-3-гидрокси-6-метилгептановую

кислоту, 2-тиенилаланин и/или D -изомеры аминокислот. Как обсуждено в данном документе, в нескольких вариантах осуществления не встречающиеся в природе аминокислоты или аналоги аминокислот могут включать делецию одной или более аминокислот из последовательности.

[0105] Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота», взаимозаменяемо употребляемые в данном документе, относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, как рибонуклеотидов, так и дезоксирибонуклеотидов. Эти термины включают, но не ограничиваются ими, ДНК, РНК, кДНК (комплементарная ДНК), мРНК (РНК-мессенджер), рРНК (рибосомная РНК), мшРНК (малая шпилечная РНК), мяРНК (малая ядерная РНК), кяРНК (короткая ядрышковая РНК), микроРНК (микроРНК), геномная ДНК, синтетическая ДНК, синтетическая РНК и/или тРНК.

[0106] Используемый в данном документе термин «оголенная ДНК» относится к ДНК (например, ДНК, не содержащей гистонов), кодирующей белок, такой как DDpp (например, CAR), которая клонируется в подходящем векторе экспрессии в правильной ориентации для экспрессии (например, плазида). Вирусные векторы, которые можно использовать для переноса и/или экспрессии ДНК, кодирующей DDpp, включают, без ограничения, лентивирусные векторы SIN, ретровирусные векторы, векторы пенистых вирусов, векторы аденовирусов, векторы аденоассоциированных вирусов (AAV), гибридные векторы и/или транспозоны плазмид (например, транспозонную систему спящей красавицы) или интегрированные векторные системы. Другие векторы, которые можно использовать в связи с созданием и использованием DDpp, описаны в данном документе или иным образом известны в данной области техники.

[0107] Используемые в данном документе термины «вектор», «вектор клонирования» и «вектор экспрессии» относятся к носителю, с помощью которого последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность, кодирующая DDpp) может поддерживаться или амплифицироваться в клетке-хозяине (например, клонирующий вектор) или вводится в клетку-хозяина, чтобы трансформировать хозяина и способствовать экспрессии (например, транскрипции и трансляции) введенной последовательности. Векторы включают плазмиды, фаги, вирусы и т.д.

[0108] «Клетка-хозяин» включает отдельную клетку или клеточную культуру, которая может быть или являлась реципиентом нуклеиновых кислот, кодирующих раскрытый DDpp. Клетки-хозяева включают, но не ограничиваются ими, вирусные частицы, фагмиды, клетки бактерий, дрожжей, растений, животных и млекопитающих. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и потомство необязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или по комплементарности всей

ДНК) исходной родительской клетке из-за естественной, случайной или преднамеренной мутации и/или изменения. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные или инфицированные *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo* с нуклеиновыми кислотами, кодирующими раскрытый DDrp. В некоторых примерах клетка-хозяин способна экспрессировать и презентовать на своей поверхности раскрытый DDrp, такой как, например, в фаговом дисплее или CAR T-клетке. «Экспрессия» включает транскрипцию и/или трансляцию.

[0109] Используемые в данном документе термины «твердая подложка», «подложка», «матрицы» и «смолы» используются взаимозаменяемо и относятся, без ограничения, к любой колонке (или материалу колонки), грануле, пробирке, чашке для микротитрования, твердой частице (например, агарозе или сефарозе), микрочипу (например, кремниевому, кремний-стеклянному или золотому чипу) или мембране (например, биологической или фильтрующей мембране), к которой может быть присоединен DDrp, антитело или другой белок (например, объединенный, связанный или прикрепленный), прямо или косвенно (например, через промежуточные звенья других партнеров по связыванию, такие как другие антитела или белок А), или в которые может быть встроен DDrp или антитело (например, через рецептор или канал). Реагенты и способы прикрепления полипептидов к твердым подложкам (например, к матрицам, смолам, пластмассам и т.д.) хорошо известны в данной области техники. Подходящие твердые носители включают, но не ограничиваются ими, хроматографическую смолу или матрицу (например, агарозные гранулы SEPHAROSE-4 FF), стенку или дно лунки в пластиковой чашке для микротитрования, биочип на основе диоксида кремния, полиакриламид, агарозу, диоксид кремния, нитроцеллюлозу, бумагу, пластик, нейлон, металл и их комбинации. DDrp и другие композиции могут быть нанесены на материал подложки нековалентной ассоциацией или ковалентной связью с использованием реагентов и методик, известных в данной области техники. В одном варианте осуществления DDrp связан с хроматографическим материалом с использованием линкера.

[0110] Используемые в данном документе термины «фармацевтически приемлемый» или «физиологически приемлемый» и их грамматические вариации, поскольку они относятся к композициям, носителям, разбавителям и реагентам, используются взаимозаменяемо и означают, что материалы способны вводиться человеку или применяться к человеку без получения терапевтически неприемлемых нежелательных физиологических эффектов, таких как тошнота, головокружение, расстройство желудка и тому подобные.

[0111] «Модулировать» означает изменение или регулировку амплитуды, частоты,

степени или активности. В другом связанном аспекте такая модуляция может быть положительно модулированной (например, увеличение частоты, степени или активности) или отрицательно модулированной (например, уменьшение частоты, степени или активности). В некоторых вариантах осуществления модуляция в положительном или отрицательном направлении относится к функции клетки, ткани или органа до введения терапевтического средства. В дополнительных вариантах осуществления модуляция в положительном или отрицательном направлении относится к нормальной, здоровой клетке, ткани или органу.

[0112] «Эффективное количество» DDpp, такого как слитый белок DDpp, как указано в данном документе, представляет собой количество, достаточное для достижения конкретно заявленной цели, такой как обеспечение наблюдаемого изменения уровня одной или более биологических активностей, связанных с мишенью, с которой связывается DDpp (например, слитый белок DDpp). В определенных вариантах осуществления изменение повышает уровень целевой активности. В других вариантах осуществления изменение понижает уровень целевой активности. «Эффективное количество» может быть определено эмпирически и стандартным способом по отношению к указанной цели. Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству DDpp, такого как слитый белок DDpp, или другому терапевтическому агенту, эффективному для «лечения» (например, уменьшения симптомов) заболевания или расстройства у субъекта (млекопитающего). Термин «терапевтически эффективное количество» также относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата.

[0113] «Пациент», «субъект», «животное» и «млекопитающее» используются взаимозаменяемо и относятся к млекопитающим, таким как пациенты-люди и приматы, не являющиеся людьми, а также к экспериментальным животным, таким как кролики, крысы и мыши, и другие животные. Животные включают всех позвоночных, например, млекопитающих и животных, отличных от млекопитающих, таких как цыплята, амфибии и рептилии. Используемый в данном документе термин «млекопитающее» относится к любому представителю класса млекопитающих, включая, без ограничения, людей и приматов, отличных от людей, таких как шимпанзе и другие виды высших обезьян и низших обезьян; сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, овец, свиней, коз и лошадей; домашних млекопитающих, таких как собаки и кошки; лабораторных животных, включая грызунов, таких как мыши, крысы и морские свинки, и тому подобные. В конкретном варианте осуществления пациент является человеком. Этот

термин не указывает на конкретный возраст или пол. Таким образом, взрослые и новорожденные субъекты, а также эмбрионы и плоды, будь то мужчины или женщины, должны быть включены в объем этого термина.

[0114] Термины «лечить», «лечение» и «процесс лечения», используемые в данном документе, относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, в которых целью является предотвращение или замедление (уменьшение или задержка) симптомов, осложнений или биохимического воздействия признаков заболевания, состояния или расстройства, ослабления симптомов или остановки или подавления дальнейшего развития заболевания, состояния или расстройства. Лечение может быть профилактическим (для предотвращения или отсрочки возникновения заболевания или для предотвращения проявления его клинических или субклинических симптомов) или терапевтическим подавлением или ослаблением симптомов после проявления заболевания, состояния или расстройства, направленного на патологическое состояние, предотвращение патологического состояния, преследовать или получить полезные результаты, или снизить шансы индивидуума на развитие состояния, даже если лечение в конечном итоге безуспешно. К числу тех, кто нуждается в лечении, относятся те, у кого уже есть это заболевание, а также те, кто склонен к заболеванию, или те, у кого это заболевание необходимо предотвратить. Лечение может осуществляться с использованием слитого белка DDpp отдельно или в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом.

[0115] «Рак», «опухоль» или «злокачественная опухоль» используются как синонимичные термины и относятся к любому из ряда заболеваний, которые характеризуются неконтролируемой, ненормальной пролиферацией клеток, способностью пораженных клеток распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему для других частей тела (метастазирование), а также любой из ряда характерных структурных и/или молекулярных особенностей. Термин «опухоль», используемый в данном документе, относится ко всем видам роста и пролиферации опухолевой клетки, будь то злокачественный или доброкачественный, и всем предраковым и раковым клеткам и тканям. «Раковая опухоль» или «злокачественная клетка» понимается как клетка, обладающая специфическими структурными свойствами, лишенная дифференцировки и способная к инвазии и метастазированию. Рак, который можно лечить с использованием слитых белков DDpp, представленных в данном документе, включает гематологические опухоли, такие как лейкозы и лимфомы, или солидные опухоли. В конкретных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, представляет собой лейкоз или лимфому. Типы раковых заболеваний, подлежащих лечению DDpp, включают, без ограничения,

карциному, бластому и саркому, а также некоторые лейкозы или лимфоидные злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли и злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Типы рака и опухолей, которые можно лечить с использованием DDpp, включают, без ограничения, рак молочной железы, легких, мозга, костей, печени, почек, толстой кишки, головы и шеи, яичников, гематопоэтические (например, лейкоз) и рак простаты. В некоторых вариантах осуществления рак и опухоли, которые можно лечить с использованием DDpp, включают рак молочной железы и яичников. Другие типы рака и опухолей, которые можно лечить с использованием DDpp-содержащих антител, описаны в данном документе или иным образом известны в данной области техники.

[0116] Термины «опухолевый антиген» или «раковый антиген» используются в данном документе взаимозаменяемо. Опухолевые и раковые антигены могут быть как «опухолеспецифичный антиген (TSA — англ.: tumor-specific antigen)», «специфичный антиген рака (CSA — англ.: cancer-specific antigen)», «опухоль-ассоциированные антигены (ТАА — англ.: tumor-associated antigen)» или «рако-ассоциированный антиген (САА — англ.: cancer-associated antigen)». TSA представляет собой антиген, который уникален для опухолевых клеток и не встречается в других клетках организма. ТАА представляет собой антиген, который обнаруживается как в опухоли, так и в некоторых нормальных клетках. Из-за динамической природы опухолей в некоторых случаях опухолевые клетки могут экспрессировать уникальные антигены на определенных стадиях, а в других также экспрессировать антигены, которые также экспрессируются на неопухолевых клетках. Таким образом, включение определенного маркера в качестве ТАА не исключает его в качестве TSA.

[0117] Используемый в данном документе термин «клетка-мишень» относится к клетке или клеткам, которые вовлечены в заболевание и могут быть мишенями композиций, содержащих DDpp. Другие клетки-мишени включают любую клетку у субъекта (например, человека или животного), на которую может быть нацелен раскрытый DDpp. Клетка-мишень может представлять собой клетку, экспрессирующую или сверхэкспрессирующую мишень, специфически связанную слитым белком DDpp.

[0118] Используемый в данном документе термин «эффекторные клетки» представляет собой лейкоциты, которые экспрессируют один или более FcR и осуществляют эффекторные функции. Предпочтительно, такие клетки экспрессируют по меньшей мере Fc(R)III и осуществляют эффекторную функцию АЗКЦ. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют (АЗКЦ), включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), естественные клетки-киллеры (NK), моноциты,

цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; причем (МКПК) и НК-клетки являются предпочтительными в определенных вариантах осуществления. Эффекторныe клетки могут быть выделены из нативного источника, например, из крови или РВМС, как описано в данном документе, или иным образом известно из уровня техники. В конкретном варианте осуществления эффекторныe клетки представляют собой эффекторныe клетки человека.

[0119] Термин «эффекторная функция» относится к специализированной иммунной функции дифференцированной клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, в том числе секрецию цитокинов.

[0120] Используемый в данном документе термин «иммунная клетка» относится к клеткам иммунной системы млекопитающих, включая, без ограничения, антигенпрезентирующие клетки, В-клетки, базофилы, цитотоксические Т-клетки, дендритные клетки, эозинофилы, гранулоциты, хелперные Т-клетки, лейкоциты, лимфоциты, макрофаги, тучные клетки, клетки памяти, моноциты, природные клетки-киллеры, нейтрофилы, фагоциты, клетки плазмы и Т-клетки.

[0121] Термины «Т-клетка» и «Т-лимфоцит» являются взаимозаменяемыми и используются в данном документе как синонимы. Примеры включают, но не ограничиваются ими, нативные Т-клетки, центральные Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки памяти или их комбинации.

[0122] Используемый в данном документе термин «иммунный ответ» относится к иммунитетам, включая, но не ограничиваясь ими, врожденный иммунитет, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет, иммунитет, воспалительный ответ, приобретенный (адаптивный) иммунитет, аутоиммунитет и/или сверхактивный иммунитет.

[0123] Используемый в данном документе термин «трансдукция» относится к введению чужеродной нуклеиновой кислоты в клетку с использованием вирусного вектора. Используемый в данном документе термин «трансфекция» относится к введению чужеродной нуклеиновой кислоты в клетку с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Термин «трансформация» означает введение «чужеродной» (например, внешней, внеклеточной или иным образом неэндогенной) последовательности нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в клетку-хозяина, так что клетка-хозяин будет экспрессировать введенную нуклеиновую кислоту для получения желаемого вещества, такого как белок или фермент, кодируемый введенной кодирующей последовательностью. Введенная последовательность нуклеиновой кислоты также может называться «клонированным» или «чужеродным» геном или последовательностью и может включать

регуляторные или контрольные последовательности, такие как стартовый кодон, стоп-кодон, промотор, сигнал-транскрипции, последовательность секреции или другие последовательности, используемые генетическим механизмом клетки. Последовательность нуклеиновой кислоты может включать нефункциональные последовательности или последовательности без известной функции. Клетка-хозяин, которая получает и экспрессирует введенную нуклеиновую кислоту (например, ДНК или РНК), была «трансформирована» и является «трансформантом» или «клоном». ДНК или РНК, введенные в клетку-хозяина, могут происходить из любого источника, включая клетки того же рода или вида, что и клетка-хозяин, или клетки другого рода или вида или могут быть не встречающимися в природе.

[0124] «Рецептор клеточной поверхности» относится к молекулам и комплексам молекул, способным принимать сигнал и передавать такой сигнал через плазматическую мембрану клетки. Примером рецептора клеточной поверхности, предложенного в данном документе, является активированный рецептор интегрин, например, активированный рецептор интегрин $\alpha\beta3$ на метастатической клетке. Используемый в данном документе термин «рецептор клеточной поверхности» также включает молекулу, экспрессируемую на поверхности клетки, которая содержит DDrp, способный связывать представляющую интерес мишень (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP). Термин «рецептор» обозначает связанный с клеткой белок, который связывается или иным образом взаимодействует с молекулой (например, лигандом) и опосредует действие лиганда на клетку. В нескольких вариантах осуществления молекула, которая взаимодействует с рецептором, представляет собой биоактивную молекулу. Мембраносвязанные рецепторы клеточной поверхности, как правило, характеризуются многодоменной структурой, включающей внеклеточный лигандсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный эффекторный домен, который обычно участвует в трансдукции сигнала.

[0125] Используемый в данном документе термин «CS1» относится к рецептору НК-клеток, регулирующему иммунные функции, который также экспрессируется на В-клетках, Т-клетках, дендритных клетках, НК-Т-клетках и моноцитах. CS1 сверхэкспрессируется при множественной миеломе и был успешно направлен на иммунотерапию множественной миеломы. Malaer & Mathew, *Am J Cancer Res.* 7(8): 1637-1641 (2017). CS1 также известен как SLAMF7, белок 19A, CRACC и CD319. Термин «CS1» включает варианты, изоформы, гомологи, ортологи и паралоги. CS1 представляет собой трансмембранный белок с различными дифференциально сплайсированными изоформами. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность

CS1 человека, содержащая 22 аминокислотных остатка N-концевой сигнальной последовательности (MAGSPTCLTIYILWQLTGSA, SEQ ID NO: 964) и внеклеточный домен, содержащий 226 N-концевых остатков (SEQ ID NO: 965), имеет номер доступа Genbank № NP_067004 (SEQ ID NO: 966). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность CS1 человека имеет номер доступа Genbank: NP_001269517, NP_001269518, NP_001269519, NP_001269520, NP_001269521, NP_001269522, NP_001269523, NP_001269524 или NP_001269525.

[0126] Используемый в данном документе термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» или несколько «CAR» относится к сконструированному рецептору, который прививает антиген или специфичность мишени к клетке (например, Т-клеткам, таким как наивные Т-клетки, Т-клетки центральной памяти, Т-клетки эффекторной памяти, НК-клетки, НКТ-клетки или их комбинации). Как известно, CAR также упоминаются как искусственные рецепторы Т-клеток, химерные рецепторы Т-клеток или химерные иммунорецепторы.

Полипептиды домена D (DDpp)

[0127] Если не указано иное, в практике раскрытых композиций и способов используются стандартные методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы, культуру ткани и трансформацию клеток), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методики обычно выполняются в соответствии со спецификациями производителя или обычно выполняются с использованием или регулярным изменением известных процедур, таких как процедуры, изложенные в Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)); PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); Oligonucleotide Synthesis (Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (Freshney, ed., 1987); Handbook of Experimental Immunology (Weir et al., eds.; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller, ed., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel., ed., 1987); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, ed., Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Mattila, et al., Nucleic Acids Res. 19: 967 (1991); Eckert, et al., PCR Methods and Applications 1: 17 (1991); PCR (McPherson, ed., IRL Press, Oxford); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, ed., 1994); Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) и Kontermann, ed., "The Antibody Engineering Lab Manual" (Springer Verlag, Heidelberg/New York, 2000); Current Protocols in Immunology (Coligan, ed., 1991); The Immunoassay Handbook (Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); и Methods of Immunological Analysis (Masseyeff., ed., Weinheim:

VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993); and Gennaro, et al. 2000, Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed. Lipincott Williams and Wilkins: Baltimore, Md., или как описано в данном документе. Если не указаны конкретные определения, номенклатура, используемая в связи с этим, а также лабораторные процедуры и техники аналитической, синтетической органической химии, и медицинской и фармацевтической химии, описанные в данном документе, являются известными и применяемыми в данной области техники. Кроме того, стандартные методы могут быть использованы для химического синтеза, химического анализа, рекомбинантного производства, очистки, фармацевтического приготовления, создания препаратов, доставки и лечения пациентов.

[0128] В соответствии с различными вариантами осуществления в данном изобретении предложен DDpp, который специфично связывает представляющую интерес мишень, выбранную из группы, состоящей из BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP и p26 AFP. В некоторых вариантах осуществления DD DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит домен D (DD), выбранный из группы, состоящей из: (a) DD, который специфически связывает BCMA и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-305 или 306; (b) DD, который специфически связывает CD123 и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 307-739 или 740; и (c) DD, который специфически связывает AFP или его фрагмент, и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 741-874 или 886-895; (d) DD, который специфически связывает p26 AFP и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 741-874 или 886-895; (e) DD, который специфически связывает CS1 (SEQ ID NO: 965) или его фрагмент, и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 896-909 или 910, (f) DD, который специфически связывает HER2 или его фрагмент, и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 911-949 или 950. Также предложены белки, содержащие варианты (a)-(f), которые сохраняют способность специфически связывать свои соответствующие мишени.

[0129] В дополнительных вариантах осуществления DD DDpp представляет собой вариант эталонной последовательности DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-949 и 950, который сохраняет способность специфически связывать мишень эталонного DD. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит аминокислотную последовательность варианта, которая имеет по меньшей мере 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 89 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 % или 98 % идентичности последовательности с эталонной последовательностью DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-949 и 950, и вариант DD сохраняет способность

специфически связывать мишень эталонной последовательности DD.

[0130] В некоторых вариантах осуществления DD DDpp представляет собой вариант эталонной последовательности связывающего BCMA DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306, который сохраняет способность специфически связывать BCMA. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит аминокислотную последовательность варианта, которая имеет по меньшей мере 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 89 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 % или 98 % идентичности последовательности с эталонной последовательностью DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306, и вариант DD сохраняет способность специфически связывать BCMA.

[0131] В некоторых вариантах осуществления DD DDpp представляет собой вариант эталонной последовательности связывающего CD123 DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740, который сохраняет способность специфически связывать CD123. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит аминокислотную последовательность варианта, которая имеет по меньшей мере 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 89 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 % или 98 % идентичности последовательности с эталонной последовательностью DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740, и вариант DD сохраняет способность специфически связывать CD123.

[0132] В некоторых вариантах осуществления DD DDpp представляет собой вариант эталонной последовательности связывающего CS1 DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910, который сохраняет способность специфически связывать CS1. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит аминокислотную последовательность варианта, которая имеет по меньшей мере 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 89 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 % или 98 % идентичности последовательности с эталонной последовательностью DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910, и вариант DD сохраняет способность специфически связывать CS1.

[0133] В некоторых вариантах осуществления DD DDpp представляет собой вариант эталонной последовательности связывающего HER2 DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950, который сохраняет способность специфически связывать HER2. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит аминокислотную последовательность варианта, которая имеет по меньшей мере 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 89 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 % или 98 % идентичности последовательности с эталонной последовательностью DD, выбранной из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950, и вариант DD сохраняет способность специфически связывать HER2.

[0134] В некоторых вариантах осуществления DD DDpp представляет собой вариант эталонной последовательности связывающего AFP DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895, который сохраняет способность специфически связывать AFP. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит аминокислотную последовательность варианта, которая имеет по меньшей мере 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 89 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 % или 98 % идентичности последовательности с эталонной последовательностью DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895, и вариант DD сохраняет способность специфически связывать AFP.

[0135] В некоторых вариантах осуществления DD DDpp представляет собой вариант эталонной последовательности связывающего p26 AFP DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 или 886-895, который сохраняет способность специфически связывать p26 AFP. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит аминокислотную последовательность варианта, которая имеет по меньшей мере 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 89 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 % или 98 % идентичности последовательности с эталонной последовательностью DD, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 или 886-895, и вариант DD сохраняет способность специфически связывать p26 AFP.

[0136] В конкретных вариантах осуществления идентичность между вариантом последовательности DD (искомая) и эталонной последовательностью DD, также называемой глобальным выравниванием последовательности, определяется с использованием компьютерной программы FASTDB на основе алгоритма Brutlag et al. *Comp. App. Biosci.* 6: 237-245 (1990). Предпочтительными параметрами, используемыми для выравнивания аминокислот FASTDB, являются: матрица=PAM 0, k-кортеж=2, штраф за несоответствие=1, штраф за присоединение=20, длина группы рандомизации=0, граничный балл=1, размер окна=длина последовательности, штраф за гэп=5, размер штрафа за гэп=0,05, размер окна=500 или длина рассматриваемой аминокислотной последовательности, что короче. Согласно данному варианту осуществления, если эталонная последовательность DD короче, чем искомая последовательность варианта DD, из-за удалений N- или C-конца, а не из-за внутренних удалений, выполняется ручное исправление результатов, чтобы принять во внимание тот факт, что программа FASTDB не учитывает усечения N- и C-концов эталонной последовательности DD при расчете глобальной процентной идентичности. Для получения эталонных последовательностей

укороченных на N- и C-концах, по отношению к искомой последовательности, процент идентичность корректируются путем подсчета количества остатков искомой последовательности, которые являются N- и C-концевыми у эталонной последовательности, которые не соответствуют/выровнены с соответствующим искомым остатком, как процент от общего количества оснований искомой последовательности. Определение того, соответствует/выровнен ли остаток, определяется по результатам выравнивания последовательности FASTDB. Этот процент затем вычитается из процента идентичности, рассчитанного вышеуказанной программой FASTDB с использованием указанных параметров, чтобы получить окончательный процент идентичности. Этот окончательный процентный показатель идентичности используется для целей данного варианта осуществления.

[0137] В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит вариант DD, содержащий аминокислотную последовательность, которая отличается от соответствующего эталонного DD с SEQ ID NO: 11-949 или 950, в двух или более категориях модификаций последовательности (то есть замен, удалений, вставок и дополнений), и вариант DD сохраняет способность связывать мишень соответствующего эталонного DD (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP и p26 AFP). Например, последовательность варианта DD может содержать комбинации аминокислотных делеций, вставок и замен по сравнению с последовательностью эталонного DD. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 аминокислотных замен по сравнению с эталонной последовательностью DD SEQ ID NO: 11-949 или 950. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 консервативных аминокислотных замен по сравнению с эталонной последовательностью DD SEQ ID NO: 11-949 или 950. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 неконсервативных аминокислотных замен по сравнению с эталонной последовательностью DD SEQ ID NO: 11-949 или 950. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 консервативных и неконсервативных аминокислотных замен по сравнению с эталонной последовательностью DD SEQ ID NO: 11-949 или 950. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 аминокислотных делеций по сравнению с эталонной последовательностью DD SEQ ID NO: 11-949 или 950. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 аминокислотных инсерций в

эталонной последовательностью DD SEQ ID NO: 11-949 или 950, и вариант DD сохраняет способность связывать мишень эталонного DD. Кроме того, предложен DDpp, содержащий вариант DD, в котором аминокислотные остатки были удалены с аминоконца, карбокси-конца или как аминоконца, так и карбокси-конца соответствующего эталонного DD SEQ ID NO: 866 и 867. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит последовательность с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотными остатками, удаленными с аминоконца эталонной последовательности DD SEQ ID NO: 11-949 или 950, и вариант DD сохраняет способность связывать мишень эталонного DD. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит последовательность с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотными остатками, удаленными с карбокси-конца эталонного DD SEQ ID NO: 11-949 или 950, и вариант DD сохраняет способность связывать мишень эталонного DD. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта DD содержит 1-5, 1-10 или 1-15 аминокислотных остатков, удаленных с аминоконца эталонной последовательности DD SEQ ID NO: 11-949 или 950, вариант последовательности DD имеет 1-5, 1-10 или 1-15, аминокислотных остатков, удаленных с карбокси-конца эталонной последовательности DD, и вариант DD сохраняет способность связывать мишень эталонного DD.

Слитые белки DDpp

[0138] «Слитый белок», «химерный полипептид», «химерный белок», «химерный антиген» и DDpp, который содержит/имеет в составе гетерологичный полипептид, представляет собой полипептид, состоящий по меньшей мере из двух полипептидов и, необязательно, линкера для функционального связывания двух полипептидов в один непрерывный полипептид, полученный, например, рекомбинантными способами. Два полипептида могут быть функционально присоединены прямо или косвенно.

[0139] «Слитый белок DDpp», предложенный в данном документе, содержит по меньшей мере один раскрытый в данном документе DDpp, который специфически связывает представляющую интерес мишень (например, BCMA (SEQ ID NO: 7), CD123 (SEQ ID NO: 8), CS1 (SEQ ID NO: 965), HER2 (SEQ ID NO: 967), AFP (SEQ ID NO: 9), p26 AFP (SEQ ID NO: 10) или их фрагмент). В одном варианте осуществления слитый белок DDpp содержит один DDpp.

[0140] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp представляет собой растворимый белок, содержащий один или более связывающих мишень DDpp и белок p26 (например, имеющий последовательность SEQ ID NO: 10, 968, 969, 970, 971, 972, 973 или 974). Было обнаружено, что такие слитые белки, содержащие

последовательности p26, имеют удивительно длинный период полужизни в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления растворимый слитый белок DDpp имеет период полужизни в плазме *in vivo*, равный по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 32 часа, по меньшей мере 64 часа, или более. В некоторых вариантах осуществления растворимый слитый белок имеет период полужизни в плазме *in vivo*, равный по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 32 часа, по меньшей мере 64 часа, или более 65 часов, или 1-10 часов, 2-10 часов, 4-10 часов, 6-10 часов или 6-9 часов у мыши. В некоторых вариантах осуществления растворимый слитый белок DDpp имеет период полужизни в плазме *in vivo*, равный по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 32 часа, по меньшей мере 64 часа, или более 65 часов, или 1-10 часов, 2-10 часов, 4-10 часов, 6-10 часов или 6-9 часов у человека.

[0141] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ модификации периода полужизни *in vivo* (например, у мыши или человека) растворимого слитого белка, содержащего белок p26 (например, имеющий последовательность SEQ ID NO: 10, 968, 969, 970, 971, 972, 973 или 974). В некоторых вариантах осуществления растворимый слитый белок p26 содержит один или более связывающих мишень DDpp. В некоторых вариантах осуществления период полужизни растворимого слитого белка p26 увеличивается или уменьшается путем замены или удаления одного или более аминокислотных остатков, обычно присутствующих в белке p26 человека, или путем вставки одного или более аминокислотных остатков, которые обычно не обнаруживаются в белке p26 человека. В другом варианте осуществления последовательность растворимого слитого белка p26 модифицируется посредством 1, 2, 3, 5, 5, 10 или 1-20, 1-10, 3-10 или 3-5 аминокислотных замен (консервативных и/или неконсервативных замен), делеций и/или вставок, чтобы увеличить или уменьшить период полужизни растворимого слитого белка *in vivo*. В конкретном варианте осуществления аминокислотный остаток, соответствующий глутамину (Gln, Q) в положении 217 SEQ ID NO: 10 из p26 замещен другими аминокислотными остатками. В дополнительном варианте осуществления замена представляет собой Gln217Pro. В другом варианте осуществления последовательность p26 растворимого слитого белка модифицируется путем делеции 1-150, 1-100, 1-50, 1-25 или 1-10 аминокислотных остатков, так чтобы увеличить или уменьшить период полужизни *in vivo* растворимого слитого белка. В дополнительных вариантах осуществления последовательность p26

растворимого слитого белка модифицируют посредством 1, 2, 3, 5, 5, 10 или 1-20, 1-10, 3-10 или 3-5 аминокислотных замен (консервативных и/или неконсервативных замен), делеций и/или вставок, чтобы увеличить или уменьшить взаимодействие растворимого слитого белка с FcRn.

Мультимерные слитые белки DDpp

[0142] В одном варианте осуществления слитый белок DDpp содержит более одного DDpp, причем два или более DDpp имеют одинаковую или различную специфичность. В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит тандемный повтор одного и того же или другого DD, который позволяет слитому белку DDpp связывать несколько мишеней и/или повторяющиеся эпитопы или разные эпитопы на одной и той же мишени. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 или более 5 DDpp. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит 1-3, 1-4, 1-5 или более 5 различных DDpp. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 или более 5 различных DDpp. Таким образом, слитый белок DDpp может представлять собой мономерный DDpp (то есть содержащий один DDpp) или мультимерный DDpp (то есть содержащий более одного DDpp в тандеме, необязательно функционально соединенных линкером). В некоторых вариантах осуществления применение мультимерного DDpp обеспечивает улучшенное (например, синергетическое) связывание с мишенью. В дополнительных вариантах осуществления мультимерный DDpp позволяет нацеливать более чем одну мишень с использованием конструкции с одним DDpp (например, двух-, трех-специфичного и т.д.). Связывание двух или более идентичных DDpp приводит к получению мультивалентной молекулы, которая обеспечивает явные преимущества (например, повышенную avidность связывания, кластеризацию мишени и активацию рецептора) по сравнению с моновалентными композициями. Связывание двух или более различных DDpp приводит к образованию мультивалентной и мультиспецифичной молекулы, которая обладает способностью связывать более одного антигена-мишени, независимо или одновременно.

[0143] Мультимерный слитый белок DDpp может быть гомомультимерным DDpp (то есть содержать более одного и того же DDpp в тандеме, необязательно соединенном линкером(ами) (например, гомодимерами, гомотримерами, гомотетрамерами и т.д.) или гетеромультимерным DDpp (т.е., содержащий два или более DDpp, в которых присутствуют по меньшей мере два разных белка DDpp. Количество мономерного DDpp, включенного в мультимерную композицию, может варьировать в зависимости от варианта осуществления и может определяться, по меньшей мере частично, системой экспрессии, в

которой продуцируется DDpp. Однако в некоторых вариантах осуществления слитые белки могут содержать мультимеры от около 5 до около 10 субъединиц DDpp, от около 10 до около 15 субъединиц, от около 15 до около 20 субъединиц, от около 20 до около 25 субъединиц или от около 25 до около 30 субъединиц (включая числа между перечисленными и конечными точками). Более того, несколько tandemных компонентов слитого белка DDpp могут содержать один и тот же или разные DDpp. В некоторых слитых DDpp DDpp присутствует в виде мономера или в гомомультимерах или гетеромерах, таких как гомодимеры или гетеродимеры, гомотримеры или гетеротримеры, гомотетрамеры или гетеротетрамеры.

[0144] Слитый белок DDpp может быть «моноспецифичным» или «мультиспецифичным». Слитый белок DDpp, который является «мультиспецифичным» (например, биспецифичным, триспецифичным или обладающим большей мультиспецифичностью), распознает и связывается с двумя или более различными эпитопами, присутствующими в одной или более различных молекулах (например, белки, твердые структуры подложки и т.д.).

[0145] В некоторых вариантах осуществления два или более DD объединены вместе в виде мультивалентного DDpp. DD мультивалентного DDpp могут быть одинаковым или различным. Таким образом, в данном изобретении предложен гомодимер DDpp (то есть DDpp, содержащий два идентичных DD), гомомультимер DDpp (то есть DDpp, содержащий три или более идентичных DD), гетеродимер DDpp (то есть DDpp, содержащий два разных DD) и DDpp гетеромультимер (то есть DDpp, содержащий три или более DD, где по меньшей мере два DD являются различными), содержащий любой из DD, описанных в данном документе, необязательно присоединенный одним или более линкерами.

[0146] В некоторых вариантах осуществления два или более DD связаны доменом мультимеризации или присоединены посредством химической связи для образования мультивалентного комплекса DD. DD мультивалентного комплекса DD могут быть одинаковым или различным. Таким образом, в данном изобретении предложен DD-гомодимерный комплекс (то есть DD-комплекс, содержащий два идентичных DD), DD-гомомультимерный комплекс (т.е. DD-комплекс, содержащий три или более идентичных DD), гетеродимерный комплекс DD (т.е. комплекс DD, содержащий два разных DD), и гетеромультимерный комплекс DD (т.е. комплекс DD, содержащий три или более DD, где по меньшей мере два из DD являются разными), содержащий любой из описанных в данном документе DD, необязательно присоединенный посредством одного или более линкеров.

[0147] В одном варианте осуществления мультиспецифичный слитый белок DDpp содержит по меньшей мере два DDpp, которые связываются по меньшей мере с двумя различными эпитопами на одной представляющей интерес мишени (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP). В дополнительном варианте осуществления слитый DDpp является биспецифичным и специфически связывается с двумя разными мишенями, экспрессируемыми на поверхности двух разных типов клеток. В одном варианте осуществления биспецифичный слитый белок DDpp специфически связывается с мишенью на раковой клетке и мишенью на иммунной эффекторной клетке. В одном варианте осуществления биспецифичный слитый белок DDpp специфически связывает мишень, экспрессируемую на раковой клетке (например, BCMA, CS1, CD123 и CD19), и мишень, экспрессируемую на поверхности Т-лимфоцита (например, CD3). В одном варианте осуществления биспецифичный слитый белок DDpp специфически связывает BCMA и CS1.

[0148] В дополнительных вариантах осуществления мультиспецифичный слитый белок DDpp содержит по меньшей мере один DDpp, который специфически связывает один эпитоп на представляющей интерес мишени, и по меньшей мере один другой домен или обеспечивающую функцию последовательность (например, фрагмент или домен антитела, такой как scFv), который специфически связывается с другим эпитопом на той же самой представляющей интерес мишени. В одном варианте осуществления мультиспецифичный слитый белок DDpp содержит, по меньшей мере, один DDpp, который специфически связывается с эпитопом с представляющей интерес мишенью, и, по меньшей мере, один другой домен или обеспечивающую функцию последовательность (например, фрагмент или домен антитела, например scFv), который специфически связывается с эпитопом на другой представляющей интерес мишени. В одном варианте осуществления мультиспецифичный слитый белок DDpp содержит, по меньшей мере, один DDpp, который специфически связывается с эпитопом на представляющей интерес мишени и по меньшей мере один другой домен или последовательность, которая специфически связывается с эпитопом на другой мишени на той же клетке. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит по меньшей мере один DDpp и по меньшей мере один другой DDpp обеспечивающую функцию последовательность домена, например фрагмент или домен антитела, который специфически связывается с твердой подложкой.

[0149] В дополнительном варианте осуществления мультимерный слитый DDpp, содержащий 2 или более DDpp, в свою очередь, сливается с другими гетерологичными белками (или их поддоменами) и при этом придает поливалентные и мультиспецифичные

свойства партнеру по слиянию. Примеры партнеров слияния DDpp включают, без ограничения, антитела, субдомены антител (например, домены scFv или Fc), сывороточный альбумин, субдомены сывороточного альбумина, рецепторы клеточной поверхности, альфа-цепь рецептора Т-клеток (TCR), бета-цепь рецептора Т-клеток, субдоменов рецепторов клеточной поверхности, пептидов, пептидных меток (например, FLAG или тус), повторы фибронектина типа III, z-домены, эластиноподобные полипептиды. Количество и расположение DDpp и их соответствующие положения в слитом белке могут варьировать. Например, DDpp могут быть расположены на одном или на всех концах партнера по слиянию и/или перемежаться в гетерологичных субъединицах партнера по слиянию DDpp.

[0150] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DDpp и полипептидную последовательность, содержащую дополнительный домен. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DDpp и член, выбранный из: антитела, фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего домена или его части (например, scFv), эффекторного домена или его части, домена связывания FcRn, или его части и Fc или его части), сывороточный белок (например, альбумин или его часть), цитокин, фактор роста, гормон, визуализирующий агент, метящий агент и пептидную метку. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит домен Fc иммуноглобулина (например, домен Fc человека) или его часть. В других вариантах осуществления домен Fc представляет собой вариант домена Fc человека.

[0151] В некоторых вариантах осуществления DDpp слит с гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид содержит полноразмерное антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления DD слит с: аминоконцом тяжелой цепи полноразмерного антитела; аминоконцом легкой цепи полноразмерного антитела; карбоксильным концом тяжелой цепи полноразмерного антитела; или карбоксильным концом легкой цепи полноразмерного антитела. В других вариантах осуществления DD слит с фрагментом антитела, который представляет собой Fc. В дополнительных вариантах осуществления гетерологичный полипептид содержит член, выбранный из группы, состоящей из: (i) трансмембранного домена; (ii) мембраносвязывающего домена; (iii) человеческого сывороточного альбумина или его фрагмента; (iv) AFP или его фрагмента; (v) p26 AFP или его фрагмента; (vi) внеклеточного домена рецептора или его фрагмента; и (vii) внеклеточного домена внутриклеточного рецептора (например, ядерного белка) или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, содержащий внеклеточный домен или фрагмент внеклеточного домена рецептора клеточной

поверхности.

[0152] В некоторых вариантах осуществления DDpp слитого белка DDpp включается в более крупный, многодоменный молекулярный комплекс (например, мономерный или мультимерный слитый белок DDpp) и при этом придает функциональные атрибуты встроенного DDpp полученному слитому белку. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DDpp и полипептидную последовательность из антитела, фрагмента антитела, белка сыворотки (например, человеческого сывороточного альбумина) или фрагмента белка сыворотки или рецептора клеточной поверхности, альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TCR), бета-цепи Т-клеточного рецептора, цитокина, фактора роста, гормона или фермента или их фрагмента. Включение DD в мультидоменные и/или мультифункциональные комплексы обычно может быть достигнуто путем рекомбинантного слияния с другим полипептидом, связывания с другим химическим фрагментом и ковалентной химической связи с другим полипептидом (или другим желательным химическим соединением) с использованием методов, известных в данной области техники. Слитые белки DDpp могут дополнительно содержать другие необязательные компоненты, такие как линкеры и другие компоненты, описанные в данном документе.

Слитые белки DDpp в качестве CAR

[0153] В дополнение к включению DD в растворимые многодоменные белки в данном изобретении предложено средство для создания связанного с клетками DDpp, состоящего по меньшей мере из одного DDpp, предназначенного для придания специфичности связывания слитому белку, связанному с мембраной. DDpp-рецепторы могут экспрессироваться любым типом клеток.

[0154] В одном варианте осуществления слитый белок DDpp-рецептора содержит химерный антигенный рецептор (CAR) или DDpp-CAR, который содержит внеклеточный нацеливающий домен и трансмембранный домен. В другом варианте осуществления DDpp-CAR состоит из внеклеточного нацеливающего домена, трансмембранного домена и цитоплазматического домена, где цитоплазматический домен содержит сигнальный домен. В дополнительном варианте осуществления внеклеточный домен DDpp-CAR содержит один или более DDpp, в которых каждый DDpp представляет собой специфический связывающий домен с одинаковыми или разными специфичностями. В некоторых вариантах осуществления специфичный для мишени домен нацелен на один (или более) из раковых или опухолевых антигенов, раскрытых в данном документе, таких как BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP и p26 AFP, в качестве неограничивающих примеров.

В одном варианте осуществления внутриклеточный домен (например, цитоплазматический домен) DDpp-CAR содержит внутриклеточный домен дзета-цепи CD3. В другом варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен DDpp состоит из части внутриклеточного домена дзета-цепи CD3. В дополнительном варианте осуществления внутриклеточный домен DDpp-CAR содержит внутриклеточный домен дзета-цепи CD3 и костимулирующую сигнальную область. Костимулирующая сигнальная область относится к части DDpp-CAR, содержащей весь внутриклеточный домен костимулирующей молекулы или его часть. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличающиеся от рецепторов антигена или их лигандов, которые требуются для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Костимулирующие молекулы и части этих молекул, которые способны придавать костимулирующие свойства AR, известны в данной области техники и могут регулярно включаться в DDpp-CAR. Кроме того, укорочения или мутации в этих внутриклеточных сигнальных и костимулирующих доменах могут быть включены для дополнительного усиления или уменьшения сигналинга рецепторов. В предпочтительных вариантах осуществления Т-клетка является генетически модифицированной для стабильной экспрессии DDpp-CAR. В таких вариантах осуществления цитоплазматический домен DDpp-CAR может быть спроектирован так, чтобы он сам содержал сигнальный домен CD28 и/или 41BB или был объединен с любым другим желаемым цитоплазматическим доменом(ами), применимым в контексте раскрытых вариантов осуществления. В одном варианте осуществления цитоплазматический домен DDpp-CAR может быть сконструирован так, чтобы дополнительно содержать сигнальный домен CD3-дзета. В одном варианте осуществления DDpp-CAR содержит внеклеточный нацеливающий домен, линкер внеклеточного белка с трансмембранным доменом, который проходит через клеточную мембрану (например, найденную в Т-клетках или НК-клетках), и цитоплазматический домен, необязательно содержащий несколько сигнальных модулей. В нескольких вариантах осуществления DDpp-CAR также может содержать эпитопную метку. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен DDpp-CAR может содержать, без ограничения, сигнальные модули CD3-дзета, 41BB и CD28 и их комбинации.

[0155] В дополнительных вариантах осуществления в данном изобретении предложен химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит нацеливающий домен, содержащий раскрытый в данном документе DDpp, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В нескольких вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен выбирают из группы, состоящей из: дзета-домена

CD3 человека, домена 41BB, домена CD28 и/или любой их комбинации. В зависимости от варианта осуществления костимулирующая сигнальная область может содержать, например, внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из: CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, антигена, связанного с функцией лимфоцитов-1 (LFA 1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7H3, лиганд, который специфически связывается с CD83, и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий домен CAR содержит множество связывающих доменов (например, DD или один или более DD и scFv), которые содержат дополнительный полипептид, связывающийся с мишенью. Также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR, которые содержат полипептиды, связывающиеся с мишенью, как часть (или вся) области нацеливания.

[0156] В данном изобретении также предложены клетки, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, причем CAR содержит антигенсвязывающий домен, состоящий, по меньшей мере, частично из раскрытого DDpp, который связывает представляющую интерес мишень (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP и p26 AFP), трансмембранный домен и сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR специфически связывается с опухолевым антигеном (и, таким образом, функционирует для доставки клетки, экспрессирующей CAR, в опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген связан с гематологическим злокачественным новообразованием. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой BCMA. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой CD123. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой CS1. В дополнительных вариантах осуществления опухолевый антиген связан с солидной опухолью. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой HER2. В некоторых вариантах осуществления мишенями являются как солидные, так и гематологические новообразования. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, представляет собой Т-клетку, клетку естественного киллера (NK) или клетку другого иммунного типа. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR (будь то Т-клетка, NK-клетка или клетка другого типа), проявляет противоопухолевый иммунитет, когда полипептид связывается с соответствующим опухолевым антигеном.

Внеклеточный домен

[0157] В зависимости от желаемого антигена, который должен представлять собой мишень, DDpp-CAR может быть сконструирован так, чтобы включать антигенсвязывающий DDpp, который специфичен для желаемого антигена-мишени. Например,

если ВСМА является желаемым антигеном, который должен представлять собой мишень, один или более ВСМА-связывающих DDpp могут быть включены в специфический домен связывания мишени DDpp-CAR. Кроме того, DDpp-CAR может содержать более одного DDpp, придавая мультиспецифичность или мультивалентность DDpp-CAR. В некоторых вариантах осуществления DDpp-CAR содержит связывающий ВСМА DDpp. В некоторых вариантах осуществления DDpp-CAR содержит связывающий CS1 DDpp. В некоторых вариантах осуществления DDpp-CAR содержит связывающий ВСМА DDpp и связывающий CS1 DDpp.

[0158] Выбор DDpp, включенного во внеклеточный домен рецептора DDpp (например, DDpp-CAR), зависит от идентичности клетки или клеток-мишеней. Например, DDpp-CAR может специфически связываться с белками клеточной поверхности, такими как рецептор, в той же клетке или другой клетке. В других вариантах осуществления DDpp-CAR специфически связывается с растворимой молекулой, такой как иммуноглобулин. В других вариантах осуществления представляющие интерес мишени, связанные с помощью DDpp-CAR, включают мишени, связанные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, заболеваниями и расстройствами иммунной системы (например, аутоиммунным заболеванием).

[0159] В других вариантах осуществления DDpp-CAR может быть выбран для распознавания лиганда, который действует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с раком. В некоторых вариантах осуществления DDpp-CAR могут быть нацелены и могут связывать опухолевый или раковый антиген (например, ТАА или другой опухолевый антиген, описанный в данном документе или иным образом известный в данной области техники). Соответственно, в данном документе предложены способы создания DDpp-CAR, их применение при создании химерных клеток, таких как человеческие Т-клетки и природные клетки-киллеры, и использование этих химерных Т-клеток в адоптивной иммунотерапии.

[0160] В контексте, представленном в данном документе, «опухолевый антиген» относится к антигенам, которые являются общими для специфических гиперпролиферативных нарушений, таких как рак. Опухолевые антигены, которые могут специфически связываться с DDpp в DDpp-CAR, раскрыты в данном документе. В одном варианте осуществления DDpp в DDpp-CAR специфически связывает опухолеспецифический антиген (TSA) или ассоциированный с опухолью антиген (ТАА). TSA уникален для опухолевых клеток и не встречается в других клетках организма. ТАА-ассоциированный антиген не является уникальным для опухолевой клетки, и вместо этого также экспрессируется на нормальной клетке в условиях, которые не позволяют

индуцировать состояние иммунологической толерантности к антигену. Экспрессия антигена на опухоль может происходить в условиях, дающих возможность иммунной системе отвечать на данный антиген. ТАА могут представлять собой антигены, экспрессирующиеся на нормальных клетках во время эмбрионального развития, когда иммунная система является незрелой и неспособной реагировать, или они могут представлять собой антигены, в нормальном состоянии представленные в чрезвычайно низких уровнях на нормальных клетках, но экспрессирующихся на намного больших уровнях на опухолевых клетках.

[0161] В некоторых вариантах осуществления DDpp в части антигенсвязывающего фрагмента DDpp-CAR специфически связывает BCMA, CS1, HER2 или CD123. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает белок BCMA, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 7. В других вариантах осуществления DDpp специфически связывает BCMA и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает белок CD123, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 8. В других вариантах осуществления DDpp специфически связывает CD123 и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает белок CS1, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 965. В других вариантах осуществления DDpp специфически связывает CS1 и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает CS1 и BCMA. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает белок HER2, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 967. В других вариантах осуществления DDpp специфически связывает HER2 и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В дополнительных вариантах осуществления часть антигенсвязывающего фрагмента DDpp-CAR дополнительно связывает мишень, выбранную из: HVEM, BTLA, DR3, CD19, CD20 и CD22.

[0162] В одном варианте осуществления DDpp в DDpp-CAR специфически связывает опухолевый антиген, связанный со злокачественной опухолью. В одном варианте осуществления DDpp в DDpp-CAR связывается с антигеном, выбранным из: В-клеточного лимфома-специфического идиотипа иммуноглобулина; антигена В-клеточной дифференцировки, такого как CD19, CD20 и CD37; TSLPR и IL7R на миелоидных клетках

и белка теплового шока gp96 на клетках множественной миеломы.

[0163] В некоторых вариантах осуществления DDpp в части антигенсвязывающего фрагмента DDpp-CAR специфически связывает AFP, p26 AFP или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает белок AFP, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 9, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления DDpp специфически связывает белок p26 AFP, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 10, или его фрагмент. В других вариантах осуществления DDpp специфически содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления часть антигенсвязывающего фрагмента DDpp-CAR дополнительно связывает опухолевый антиген. В дополнительных вариантах осуществления часть антигенсвязывающего фрагмента DDpp-CAR дополнительно связывает мишень, выбранную из: BCMA, CD123, CS1, HER2, HVEM, VTLA, DR3, CD19, CD20 и CD22.

Трансмембранный домен

[0164] «Трансмембранный домен» (TMD) в контексте данного описания относится к области клеточной поверхности, экспрессируемой слитым белком DDpp, таким как DDpp-CAR, которая проникает через плазматическую мембрану. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен DDpp-CAR является трансмембранной областью трансмембранного белка (например, трансмембранного белка типа I), искусственной гидрофобной последовательности или их комбинации. Другие трансмембранные домены будут очевидны для специалистов в данной области техники и могут использоваться в связи с альтернативными вариантами осуществления, предложенными в данном документе.

[0165] Рецептор DDpp (например, DDpp-CAR) может быть сконструирован так, чтобы он содержал трансмембранный домен, который слит с внеклеточным доменом рецептора DDpp. Как описано выше, слияние внеклеточных и трансмембранных доменов может осуществляться с линкером или без него. В одном варианте осуществления используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в DDpp-CAR. В конкретном варианте осуществления трансмембранный домен в DDpp-CAR представляет собой трансмембранный домен CD8. В некоторых случаях трансмембранный домен DDpp-CAR содержит шарнирный домен CD8. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен выбирают или модифицируют путем замены аминокислот для стимуляции или ингибирования ассоциации с другими белками поверхностной мембраны.

[0166] Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, то домен может быть образован из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные области, которые могут использоваться в данных целях, могут быть получены из (т.е., содержат по меньшей мере трансмембранную область(и)) члена, выбранного из группы: альфа, бета или дзета цепи Т-клеточного рецептора; CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В качестве альтернативы, трансмембранный домен может быть синтетическим, и в этом случае трансмембранный домен DDpp-CAR будет содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В дополнительных вариантах осуществления трансмембранный домен содержит триплет фенилаланин, триптофан и валин на каждом конце синтетического трансмембранного домена.

[0167] Используемый в данном документе термин «внеклеточный спейсерный домен» (ESD) относится к гидрофильной области, которая находится между антигенспецифической нацеливающей областью и трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления DDpp-CAR содержат внеклеточный спейсерный домен. В других вариантах осуществления DDpp-CAR не содержат внеклеточный спейсерный домен. Внеклеточные спейсерные домены включают, без ограничения, Fc-фрагменты антител или их фрагменты или производные, шарнирные области антител или фрагменты или их производные, CH2-области антител, CH3-области антител, искусственные спейсерные последовательности или их комбинации. Дополнительные примеры внеклеточных спейсерных доменов включают, без ограничения, шарнир CD8a и искусственные спейсеры, сделанные из полипептидов, которые могут быть такими маленькими, как, например, домены Gly3 или CH1 и CH3 IgG (такие как IgG4 человека). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный спейсерный домен представляет собой любую одну или более из (i) шарнирной области, CH2 и CH3-областей IgG4, (ii) шарнирной области IgG4, (iii) шарнирной области и области CH2 IgG4, (iv) шарнирной области CD8a, (v) шарнирной области, областей CH2 и CH3 IgG1, (vi) шарнирная область IgG1 или (vi) шарнирной области и области CH2 IgG1. Другие внеклеточные спейсерные домены будут очевидны для специалистов в данной области техники и могут использоваться в связи с альтернативными вариантами осуществления, предложенными в данном документе.

[0168] В некоторых вариантах осуществления короткий олиго- или полипептидный линкер, длиной от около 1 до 100 аминокислот, используется для связывания воедино любого из доменов DDpp-CAR. Линкеры могут состоять из гибких остатков, таких как

глицин и серин (или любая другая аминокислота), так что смежные белковые домены могут свободно перемещаться относительно друг друга. Состав аминокислотной последовательности линкера может быть выбран для минимизации потенциальной иммуногенности DDpp-CAR или слитого белка DDpp. Более длинные линкеры могут быть использованы, когда желательно гарантировать, что два соседних домена не будут стерически мешать друг другу. В некоторых вариантах осуществления предпочтительно от 2 до 10 аминокислот в длину образуют связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом DDpp-CAR. В дополнительных вариантах осуществления линкер имеет длину от 10 до 15 аминокислот, или от 15 до 20, или от 20 до 30, или от 30 до 60, или от 60 до 100 аминокислот (или любой интервал между указанными значениями). В дополнительных вариантах осуществления линкер представляет собой последовательность глицин-сериновый дублет. В других вариантах осуществления используется фрагмент шарнирной области, полученный из альфа-цепи гликопротеина CD8 поверхности Т-клеток человека (например, в диапазоне аминокислотных положений 138-182 альфа-цепи CD8; номер доступа Swiss-Prot P01732). В дополнительных вариантах осуществления используется фрагмент шарнирной области CD8, который был дополнительно модифицирован путем замены аминокислот для улучшения функции экспрессии или иммуногенности. В дополнительных вариантах осуществления используется фрагмент внеклеточной области, полученный из CD28 человека. В других вариантах осуществления используется фрагмент внеклеточной области CD28, который был дополнительно модифицирован посредством замены аминокислот для улучшения функции экспрессии или иммуногенности.

Внутриклеточный домен

[0169] Используемый в данном документе термин «внутриклеточный сигнальный домен» (ISD) или «цитоплазматический домен» относится к части DDpp-CAR, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение своей специализированной функции. Цитоплазматический домен (т.е. внутриклеточный сигнальный домен) DDpp-CAR отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, сконструированной для экспрессии DDpp-CAR. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может включать цитолитическую активность и хелперную активность, в том числе секрецию цитокинов. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка DDpp-CAR, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя обычно можно использовать весь внутриклеточный

сигнальный домен, соответствующий природному рецептору, во многих случаях нет необходимости использовать всю цепь. В той мере, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо интактной цепи до тех пор, пока она будет передавать сигнал эффекторной функции. Таким образом, подразумевается, что термин внутриклеточный сигнальный домен включает в себя любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен в DDpp-CAR содержит цитоплазматические последовательности рецептора Т-клеток (TCR), а также последовательность ко-рецепторов, которые действуют совместно, иницируя трансдукцию сигнала после включения антигенного рецептора, или любое производное или вариант этих последовательностей, которые имеют функциональные возможности. Примеры доменов, которые передают сигнал эффекторной функции, включают, без ограничения, ζ -цепь рецепторного комплекса Т-клеток или любой из его гомологов (например, η -цепь, Fc γ R1 и β -цепи, цепь MB 1 (Iga), B29 (Ig) цепь и т.д.), дзета-цепь CD3 человека, полипептиды CD3 (Δ , δ и ϵ), тирозинкиназы семейства syk (Syk, ZAP 70 и т.д.), тирозинкиназы семейства src (Lck, Fyn, Lyn и т.д.) и другие молекулы, участвующие в трансдукции Т-клеток, такие как CD2, CD5 и CD28.

[0170] Известно, что создаваемые только TCR сигналы недостаточны для полной активации Т-клетки, и что также требуется вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток может опосредоваться двумя различными классами цитоплазматических последовательностей сигнализации: теми что иницируют антигензависимую первичную активацию посредством TCR (последовательности первичной цитоплазматической сигнализации) и теми что действуют независимым от антигенов образом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (последовательности вторичной цитоплазматической сигнализации).

[0171] Последовательности первичной цитоплазматической сигнализации регулируют первичную активацию комплекса TCR либо стимулирующим путем, либо ингибирующим путем. Последовательности первичной цитоплазматической сигнализации, действующие стимулирующим путем, могут содержать мотивы сигнализации, которые известны как тирозинсодержащие активационные мотивы или ITAM.

[0172] Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые особенно применимы в предложенных вариантах осуществления, включают последовательности, полученные из TCR дзета, FcR гамма, FcR

бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Особенно предпочтительно, чтобы цитоплазматическая сигнальная молекула в CAR содержала цитоплазматическую сигнальную последовательность, полученную из CD3 дзета.

[0173] Термин «костимуляторный домен» (CSD) в контексте данного описания относится к части CAR или DDpp-CAR, которая усиливает пролиферацию, выживание и/или развитие клеток памяти. DDpp-CAR может содержать один или более костимуляторных доменов. Каждый костимуляторный домен содержит костимуляторный домен любого одного или более, например, члена суперсемейства TNFR, выбранного из CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30 и CD40 или их комбинацию. Другие костимулирующие домены (например, из других белков) будут очевидны для специалистов в данной области техники и могут использоваться в связи с альтернативными вариантами осуществления изобретения, охватываемыми данным описанием.

[0174] В предпочтительном варианте осуществления цитоплазматический домен DDpp-CAR содержит CD3-дзета-сигнальный домен сам по себе или в сочетании с любым другим желаемым цитоплазматическим доменом(ами), пригодным в контексте DDpp-CAR. Например, цитоплазматический домен DDpp-CAR может содержать часть цепи CD3 дзета и костимулирующую сигнализирующую область. Костимулирующая сигнальная область относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличающуюся от рецептора антигена или его лигандов, которая требуется для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 41BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, ассоциированный с функционированием лимфоцитов антиген-1 (LFA1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7H3, TIM1 и LAG3.

[0175] Полипептидные линкеры могут быть расположены между соседними элементами DDpp-CAR. Например, линкеры могут быть расположены между соседними DDpp или между DDpp и трансмембранным доменом или между трансмембранным доменом и цитоплазматическим доменом или между соседними цитоплазматическими доменами. Цитоплазматические сигнальные последовательности в цитоплазматической сигнальной части DDpp-CAR могут быть связаны друг с другом в случайном или заданном порядке. Необязательно, короткий линкер, предпочтительно от 2 до 10 аминокислот в длину, может образовывать связь. Глицин-сериновый дублет обеспечивает особенно подходящий линкер.

[0176] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит домен связывания мишени, содержащий раскрытый в данном документе DD (например, DD, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11-949 или 950). В некоторых вариантах осуществления DD связывает BCMA и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления DD связывает CD123 и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления DD связывает CS1 и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления DD связывает HER2 и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления DD связывает AFP и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления DD связывает p26 AFP и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен связывания мишени, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит трансмембранный домен 41BB или CD28. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, который выбирают из группы, состоящей из домена альфа-, бета- или дзета- цепи рецептора Т-клеток человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из: CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, антигена, связанного с функцией лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, который специфически связывается с CD83, и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит второй домен связывания мишени, имеющий ту же или другую мишень, что и домен связывания мишени на основе DD. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит первый домен связывания мишени, который связывает CS1, и второй домен связывания мишени, который связывает BCMA. В некоторых вариантах осуществления CAR экспрессируется в иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку (CAR Т-клетку) или клетку естественного киллера (NK) (CAR NK-клетку). В некоторых вариантах осуществления CAR связан с

липосомой. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит 2, 3, 4, 5 или более 5, DD и/или других связывающих доменов (например, scFv), которые специфически связывают представляющую интерес мишень (например, BCMA, CS1 или CD123), экспрессируемую на поверхности раковой клетки. В дополнительных вариантах осуществления CAR содержит 2, 3, 4, 5 или более 5, DD или других связывающих доменов (например, scFv), которые специфически связывают вторую другую представляющую интерес мишень (например, scFv), экспрессируемую на поверхности раковой клетки. В дополнительных вариантах осуществления вводимый CAR дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5, DD или других связывающих доменов (например, scFv), которые специфически связывают вторую другую представляющую интерес мишень, экспрессируемую второй другой раковой клеткой или сосудистой эндотелиальной клеткой.

Дополнительные слитые белки DDpp

[0177] В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, содержащий фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот внеклеточного домена рецептора клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, который содержит внеклеточный домен, или фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, который содержит внеклеточный домен, или фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8) или CS1 (SEQ ID NO: 965). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, который содержит внеклеточный домен, или фрагмент внеклеточного домена рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96.

[0178] В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, который содержит сывороточный белок или антигенный фрагмент сывороточного белка (например, AFP и p26 AFP). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, содержащий фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот сывороточного белка. В некоторых вариантах осуществления белок содержит гетерологичный полипептид, который содержит внутриклеточный белок или антигенную часть внутриклеточного белка (например, ядерного белка). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, содержащий

фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот внутриклеточного белка. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит гетерологичный полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 10, 968, 969, 970, 971, 972, 972 или 974.

[0179] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp специфически связывает BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP и/или p26 AFP и дополнительно связывает одну или более дополнительных представляющих интерес мишеней. Представляющие интерес мишени, специфически связанные слитым белком DDpp, могут представлять собой любую молекулу, с которой желательно связать DDpp. Например, мишенями, специфически связанными слитым белком DDpp, могут быть BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP и/или p26 AFP и, кроме того, любая дополнительная мишень для производственной, рецептурной, терапевтической, диагностической или прогностической значимости или ценности. Ряд иллюстративных дополнительных мишеней предоставлен в качестве примера и предназначен для иллюстрации, а не для ограничения. Дополнительная представляющая интерес мишень, связанная слитым белком DDpp, может быть встречающейся в природе или синтетической. Дополнительная представляющая интерес мишень может представлять собой внеклеточный компонент, внутриклеточный компонент, растворимый фактор (например, фермент, гормон, цитокин и фактор роста, токсин, яд, загрязнитель и т.д.) или трансмембранный белок (например, рецептор клеточной поверхности). В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень, связанная слитым белком DDpp, представляет собой белок человека. В одном варианте осуществления DDpp (например, слитый белок DDpp) связывает представляющий интерес белок-мишень человека и его ортолог обезьяны (например, яванского макака), мыши, кролика, хомяка и/или кролика.

[0180] В одном варианте осуществления слитый белок DDpp специфически связывает BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP и/или p26 AFP и белок сыворотки. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp специфически связывает сывороточный белок, выбранный из: сывороточного альбумина (например, человеческого сывороточного альбумина (ЧСА)), тироксинсвязывающего белка, трансферрина, фибриногена и иммуноглобулина (например, IgG, IgE и IgM). Без ограничения какой-либо теорией, связывание DDpp с белком-носителем, как полагают, придает DDpp (или его слитому белку) улучшенный фармакодинамический профиль, который включает, без ограничения, улучшенное нацеливание на опухоль, проникновение в опухоль, диффузию в опухоли и усиление терапевтической активности по сравнению со слитым белком DDpp, в котором отсутствует последовательность, связывающая белок-носитель (см., например, WO

01/45746, содержание которой полностью включено в данное описание в качестве ссылки).

Слитые белки DDpp на основе антител

[0181] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело или фрагмент или субдомен антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело, которое специфически связывается с раковым антигеном. В других вариантах осуществления DDpp содержит коммерчески одобренное терапевтическое антитело (например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, вельтузумаб, MEDI-551, эпратузумаб, белилумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN882). В других вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок Fc. В других вариантах осуществления белок Fc содержит вариант домена Fc человека.

[0182] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело или фрагмент или субдомен антитела (например, антитело IgG1, антитело IgG3, варьируемую область антитела, CDR3, scFv, Fc, FcRn-связывающий субдомен и другие субдомены антитела). Белки DDpp могут быть функционально связаны друг с другом и/или с одним или более концами антитела, цепи антитела, фрагмента антитела или субдомена антитела с образованием слитого белка DDpp.

[0183] Компонент-антитело слитого белка DDpp может представлять собой любой подходящий полноразмерный иммуноглобулин или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий домен и/или эффекторный домен) или их фрагмент. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp-антитело сохраняет структурные и функциональные свойства традиционного моноклонального антитела. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-антитело сохраняет свойства связывания эпитопа, но преимущественно также содержит посредством слияния DDpp одну или более дополнительных специфичностей связывания с мишенью. Антитела, которые можно использовать при слиянии DDpp, включают, без ограничения, моноклональные, мультиспецифические, человеческие, гуманизированные, приматизированные и химерные антитела. Молекулы иммуноглобулина или антитела, представленные в данном документе, могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина. В конкретных вариантах осуществления антитела представляют собой Fc-оптимизированные антитела. Антитела могут быть или получены из любого животного, включая птиц и млекопитающих, или могут быть созданы

синтетически. Антитело-компонент слитого белка DDpp-антитело может быть получен естественным путем или в результате рекомбинантной инженерии (например, фаговый дисплей, ксеномышь и синтез). В некоторых вариантах осуществления антитело-компонент слитого белка антитело-DDpp увеличивает период полужизни и увеличивает или уменьшает активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и/или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ). В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В конкретных вариантах осуществления антитела являются человеческими.

[0184] Обычно считается, что константная область опосредует несколько эффекторных функций. Например, связывание компонента комплемента C1 с антителами активирует систему комплемента. Активация комплемента важна в опсонизации и лизисе клеточных патогенов. Активация комплемента также стимулирует воспалительный ответ и может также участвовать в аутоиммунной гиперчувствительности. Кроме того, антитела связываются с клетками через Fc-область, при этом сайт Fc-рецептора на Fc-области антитела связывается с Fc-рецептором (FcR) на клетке. Существует ряд рецепторов Fc, которые специфичны для различных классов антител, включая IgG (гамма-рецепторы), IgE (эта-рецепторы), IgA (альфа-рецепторы) и IgM (мю-рецепторы). Связывание антитела с Fc-рецепторами на клеточных поверхностях запускает ряд важных и разнообразных биологических реакций, включая поглощение и разрушение покрытых антителом частиц, клиренс иммунных комплексов, лизис покрытых антителом клеток-мишеней клетками-киллерами (называемыми антителозависимая клеточная опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), высвобождение медиаторов воспаления, перенос плаценты и контроль продукции иммуноглобулина.

[0185] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc имеет измененную эффекторную функцию, которая, в свою очередь, влияет на биологический профиль вводимого слитого белка DDpp-Fc. Например, делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или других средств) субдомена константной области может снижать связывание Fc-рецептора циркулирующего модифицированного антитела. В других случаях модификации константной области может обеспечивать умеренное связывание комплемента и, таким образом, уменьшать период полужизни в сыворотке и неспецифическую ассоциацию конъюгированного цитотоксина. Еще другие модификации константной области могут быть использованы для устранения дисульфидных связей или олигосахаридных фрагментов, которые обеспечивают улучшенную локализацию благодаря повышенной специфичности антигена или гибкости антител. Подобным

образом, модификации константной области в соответствии с данным изобретением могут быть легко выполнены с использованием биохимических или молекулярных технологий, известных специалистам в данной области техники.

[0186] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc не имеет одной или более эффекторных функций. Например, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc не обладает активностью антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и/или активностью комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc не связывается с рецептором Fc и/или факторами комплемента. В определенных вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc не имеет эффекторной функции. Примеры инженерных модификаций последовательности Fc, которые снижают или устраняют активность АЗКЦ и/или КЗЦ и связывание с рецептором Fc и/или фактором комплемента, описаны в данном документе или известны в данной области техники, как и анализы и процедуры для их тестирования.

[0187] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc сконструирован для слияния домена CH3 непосредственно с шарнирной областью соответствующего модифицированного антитела. В других конструкциях пептидный спейсер вставлен между шарнирной областью и модифицированными доменами CH2 и/или CH3. Например, могут быть экспрессированы совместимые конструкции, в которых домен CH2 был удален, а оставшийся домен CH3 (модифицированный или немодифицированный) соединен с шарнирной областью с 5-20 аминокислотными спейсерами. Такой спейсер может быть добавлен, например, для обеспечения того, чтобы регуляторные элементы константной области оставались свободными и доступными или чтобы шарнирная область оставалась гибкой. Аминокислотные спейсеры могут в некоторых случаях оказаться иммуногенными и вызывать нежелательный иммунный ответ против конструкции. Соответственно, в определенных вариантах осуществления любой спейсер, добавленный в конструкцию, может быть относительно неиммуногенным или даже вообще отсутствовать, чтобы поддерживать желаемые биохимические качества модифицированного слитого белка DDpp-Fc.

[0188] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp-Fc модифицируют частичной делецией или заменой нескольких или даже одной аминокислоты в константной области. Например, мутации одной аминокислоты в выбранных областях домена CH2 может быть достаточно, чтобы существенно уменьшить связывание Fc и тем самым. Аналогично, один или более доменов константной области, которые контролируют эффекторную функцию (например, связывание комплемента C1Q),

могут быть полностью или частично удалены. Такие частичные делеции константных областей могут улучшить выбранные характеристики слитого белка DDpp-Fc (например, период полужизни в сыворотке), оставляя при этом нетронутыми другие желательные функции, связанные с соответствующим доменом константной области. В некоторых вариантах осуществления константная область слитого белка DDpp-Fc модифицируется посредством мутации или замены одной или более аминокислот, что усиливает профиль получаемой конструкции. В этом отношении можно нарушать активность, обеспечиваемую консервативным сайтом связывания (например, связывание Fc), в то же время по существу сохраняя конфигурацию и иммуногенный профиль модифицированного слитого белка DDpp-Fc. В данном изобретении также предложен слитый белок DDpp-Fc, который содержит добавление одной или более аминокислот к константной области для усиления желаемых характеристик, таких как уменьшение или увеличение эффекторной функции или предоставление сайтов присоединения для одной или более цитотоксиновых, меточных или углеводных групп. В таких вариантах осуществления может быть желательным вставлять или реплицировать конкретные последовательности, полученные из выбранных доменов константной области.

[0189] В некоторых вариантах осуществления DDpp функционально связан с фрагментом или поддоменом антитела (например, scFv, диатело, EP 404097; WO 93/111161; WO 14/028776 и Holliger et al., PNAS 90: 6444-6448 (1993), содержание каждого из которых включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме. Фрагмент или поддомен антитела может представлять собой любой фрагмент или домен антитела. См., например, WO04/058820, WO99/42077 и WO05/017148, содержание каждого из которых включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме. Например, слитый белок DDpp может содержать эффекторный домен антитела или производное эффекторного домена антитела, которое наделяет DDpp одной или более эффекторными функциями и/или наделяет слитый белок DDpp способностью связываться с одним или более Fc-рецепторами. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp-антитело содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела или его фрагмент. В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp-антитело содержит эффекторный домен иммуноглобулина, который содержит один или более доменов CH2 и/или CH3 антитела, обладающего эффекторной функцией, обеспечиваемой доменами CH2 и CH3. Другие последовательности в слитом DDpp, которые обеспечивают эффекторную функцию и охватываются изобретением, будут понятны специалистам в данной области техники и могут быть обычно выбраны и объединены в слитый белок DDpp, охватываемый в данном документе, на основе желаемой эффекторной функции(й).

[0190] В одном варианте осуществления слитый DDpp содержит полноразмерное антитело или фрагмент антитела, который является антигенсвязывающим фрагментом. В дополнительном варианте осуществления антитело или фрагмент антитела связывают связанный с заболеванием антиген. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp содержит антитело или фрагмент антитела, которое специфически связывается с раковым антигеном. В другом варианте осуществления слитый белок DDpp содержит антитело или фрагмент антитела, который специфически связывает определенный патоген (например, бактериальную клетку (например, туберкулез, оспу, сибирскую язву)), вирус (например, ВИЧ), паразит (например, малярия, лейшманиоз), инфекцию, вызванную грибами, плесень, микоплазма, прионный антиген. В другом варианте осуществления слитый белок DDpp содержит антитело или фрагмент антитела, который специфически связывает определенный патоген (например, бактериальную клетку (например, туберкулез, оспа, сибирская язва)), вирус (например, ВИЧ), паразита (например, малярия, лейшманиоз), инфекцию, вызванную грибами, плесень, микоплазма или прионный антиген. В другом варианте осуществления слитый белок DDpp содержит антитело или фрагмент антитела, который специфически связывает антиген, связанный с заболеванием или расстройством иммунной системы.

[0191] В предпочтительных вариантах осуществления слитый белок DDpp, содержащий фрагмент или домен антитела, сохраняет активность родительского антитела. Таким образом, в определенных вариантах осуществления слитый белок DDpp, содержащий фрагмент или домен антитела, способен индуцировать комплемент-зависимую цитотоксичность. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp, содержащий фрагмент или домен антитела, способен индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ).

[0192] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент антитела, который придает слитому белку DDpp биологическую или биохимическую характеристику иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела придает характеристику, выбранную из: способности нековалентно димеризоваться, способности локализоваться в месте опухоли и увеличенного периода полужизни в сыворотке по сравнению со слитым белком DDpp, в котором один или более DDpp были удалены. В определенных вариантах осуществления слитый белок DDpp является по меньшей мере таким же стабильным, как и соответствующее антитело без присоединенного DDpp. В определенных вариантах осуществления слитый белок DDpp является более стабильным, чем соответствующее антитело без присоединенного DDpp. Стабильность слитого белка DDpp может быть

измерена с использованием установленных методов, включая, например, методы ИФА. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp стабилен в цельной крови (*in vivo* или *ex vivo*) при 37 °C в течение по меньшей мере около 10 часов, по меньшей мере около 15 часов, по меньшей мере около 20 часов, по меньшей мере около 24 часов, по меньшей мере около 25 часов, по меньшей мере около 30 часов, по меньшей мере около 35 часов, по меньшей мере около 40 часов, по меньшей мере около 45 часов, по меньшей мере около 48 часов, по меньшей мере около 50 часов, по меньшей мере около 55 часов, по меньшей мере около 60 часов, по меньшей мере около 65 часов, по меньшей мере около 70 часов, по меньшей мере около 72 часов, по меньшей мере около 75 часов, по меньшей мере около 80 часов, по меньшей мере около 85 часов, по меньшей мере около 90 часов, по меньшей мере около 95 часов или по меньшей мере около 100 часов (включая любое время между перечисленным). В одном варианте осуществления слитый белок DDpp содержит эффекторный домен иммуноглобулина или домен, влияющий на период полужизни, который соответствует домену или фрагменту иммуноглобулина, в котором по меньшей мере часть одного или более доменов константной области была изменена, чтобы обеспечить желаемые биохимические характеристики такие как сниженные или повышенные эффекторные функции, способность нековалентно димеризоваться, повышенная способность локализоваться в месте опухоли, уменьшенное время полужизни в сыворотке или увеличенное время полужизни в сыворотке по сравнению с фрагментом иммуноглобулина, имеющим соответствующую неизмененную последовательность иммуноглобулина. Эти изменения доменов константной области могут быть аминокислотными заменами, вставками или делециями.

[0193] В одном варианте осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, который придает антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) слитому белку DDpp. В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для увеличения АЗКЦ (см., например, Bruhns, *Blood* 113: 3716-3725 (2009); Shields, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 (2001); Lazar, *PNAS* 103: 4005-4010 (2006); Stavenhagen, *Cancer Res.* 67: 8882-8890 (2007); Horton, *Cancer Res.* 68: 8049-8057 (2008); Zalevsky, *Blood* 113: 3735-3743 (2009); Bruckheimer, *Neoplasia* 11: 509-517 (2009); WO06/020114; Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20: 685-691 (2009) и WO 04/074455, содержание каждого из которых включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме). Примеры модификаций инженерных фрагментов иммуноглобулина, содержащихся в

аминокислотной последовательности в слитом белке DDpp, который увеличивает АЗКЦ, включают последовательности эффекторного домена иммуноглобулина, имеющие одну или более модификаций, соответствующих: IgG1-S298A, E333A, K334A; IgG1-S239D, I332E; IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG1-P247I, A339D или Q; IgG1-D280H, K290S с или без S298D или V; IgG1-F243L, R292P, Y300L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, P396L и IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L; где нумерация остатков в области Fc соответствует нумерации индекса EU Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition, содержание которого полностью включено в данное описание посредством ссылки).

[0194] В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для уменьшения АЗКЦ (см., например, Idusogie et al., J. Immunol. 166: 2571-2575 (2001); Sazinsky et al., PNAS 105: 20167-20172 (2008); Davis et al., J. Rheumatol. 34: 2204-2210 (2007); Bolt et al., Eur. J. Immunol. 23: 403-411 (1993); Alegre et al., Transplantation 57: 1537-1543 (1994); Xu et al., Cell Immunol. 200: 16-26 (2000); Cole et al., Transplantation 68: 563-571 (1999); Hutchins et al., PNAS 92: 11980-11984 (1995); Reddy et al., J. Immunol. 164: 1925-1933 (2000); WO97/11971; WO07/106585; US 2007/0148167A1; McEarchern et al., Blood 109: 1185-1192 (2007); Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20: 685-691 (2009); and Kumagai et al., J. Clin. Pharmacol. 47: 1489-1497 (2007), содержание каждого из которых включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме. Примеры модификаций последовательностей инженерных фрагментов иммуноглобулина, содержащихся в аминокислотной последовательности в слитом белке DDpp, который уменьшает АЗКЦ, включают последовательности эффекторного домена иммуноглобулина, имеющие одну или более модификаций, соответствующих: IgG1-K326W, E333S; IgG2-E333S; IgG1-N297A; IgG1-L234A, L235A; IgG2-V234A, G237A; IgG4-L235A, G237A, E318A; IgG4-S228P, L236E; IgG2- 118-260; IgG4- 261-447; IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG1-C220S, C226S, C229S, p268S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A или IgG1-L234F, L235E, P331S; где нумерация остатков соответствует нумерации индекса EU Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition, содержание которого полностью включено в данное описание посредством ссылки).

[0195] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, который придает антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ) слитому белку DDpp. В

дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для увеличения антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ) (см., например, Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 (2001); Lazar et al., *PNAS* 103: 4005-4010 (2006); Stavenhagen et al., *Cancer Res.* 67: 8882-8890 (2007); Richards et al., *Mol. Cancer Ther.* 7: 2517-2527 (2008); Horton et al., *Cancer Res.* 68: 8049-8057 (2008), Zalevsky et al., *Blood* 113: 3735-3743 (2009); Bruckheimer et al., *Neoplasia* 11: 509-517 (2009); WO06/020114; Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20: 685-691 (2009) и WO 04/074455, содержание каждого из которых включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме). Примеры модификаций инженерных фрагментов иммуноглобулина, содержащихся в аминокислотной последовательности в слитом белке DDpp, который увеличивает АЗКФ, включают последовательности эффекторного домена иммуноглобулина, имеющие одну или более модификаций, соответствующих: IgG1-S298A, E333A, K334A; IgG1-S239D, I332E; IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG1-P247I, A339D или Q; IgG1-D280H, K290S с или без S298D или V; IgG1-F243L, R292P, Y300L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, P396L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L и IgG1-G236A, S239D, I332E; где нумерация остатков в области Fc соответствует нумерации индекса EU Kabat et al. (Kabat et al., *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, содержание которого полностью включено в данное описание посредством ссылки).

[0196] В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для уменьшения АЗКФ (см., например, Sazinsky et al., *PNAS* 105: 20167-20172 (2008); Davis et al., *J. Rheumatol.* 34: 2204-2210 (2007); Bolt et al., *Eur. J. Immunol.* 23: 403-411 (1993); Alegre et al., *Transplantation* 57: 1537-1543 (1994); Xu et al., *Cell Immunol.* 200: 16-20 (2000); Cole et al., *Transplantation* 68: 563-571 (1999); Hutchins et al., *PNAS* 92: 11980-11984 (1995); Reddy et al., *J. Immunol.* 164: 1925-1933 (2000); WO97/11971; WO07/106585; US 2007/0148167A1; McEarchern et al., *Blood* 109: 1185-1192 (2007); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20: 685-691 (2009); and Kumagai et al., *J. Clin. Pharmacol.* 47: 1489-1497 (2007), содержание каждого из которых включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме. Например, слитые белки DDpp могут содержать фрагмент или домен антитела, который содержит одну или более из следующих модификаций, которые уменьшают АЗКФ: IgG1-N297A; IgG1-L234A, L235A; IgG2-V234A, G237A; IgG4-L235A, G237A, E318A; IgG4-S228P, L236E; последовательность EU IgG2 118-260; последовательность IgG4-EU 261-447; IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG1-C220S, C226S, C229S, p268S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A и IgG1-L234F, L235E,

P331S; где нумерация остатков соответствует нумерации индекса EU Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition, содержание которого полностью включено в данное описание посредством ссылки).

[0197] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, который придает комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) слитому белку DDpp. В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для увеличения комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) (см., например, Idusogie et al., J. Immunol. 166: 2571-2575 (2001); Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20: 685-691 (2009) и Natsume et al., Cancer Res. 68: 3863-3872 (2008), содержание каждого из которых включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме. Например, слитые белки DDpp могут содержать фрагмент или домен антитела, который содержит одну или более из следующих модификаций, которые увеличивают КЗЦ: IgG1-K326A, E333A; IgG1-K326W, E333S, IgG2-E333S; где нумерация остатков соответствует нумерации индекса EU Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition, содержание которого полностью включено в данное описание посредством ссылки).

[0198] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, который обеспечивает слитому белку DDpp способность связывать рецептор FcγRIIb. В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для увеличения ингибирующего связывания с рецептором FcγRIIb (см., например, Chu et al., Mol. Immunol. 45: 3926–3933 (2008)). Примером модификаций сконструированного фрагмента иммуноглобулина, содержащихся в аминокислотной последовательности в слитом белке DDpp, которые увеличивают связывание с ингибирующим рецептором FcγRIIb, является IgG1-S267E, L328F.

[0199] В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для уменьшения КЗЦ (см., например, WO97/11971; WO07/106585; US 2007/0148167A1; McEarchern et al., Blood 109: 1185-1192 (2007); Hayden-Ledbetter et al., Clin. Cancer 15: 2739-2746 (2009); Lazar et al., PNAS 103: 4005-4010 (2006); Bruckheimer et al., Neoplasia 11: 509-517 (2009); Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20: 685-691 (2009) и Sazinsky

et al., PNAS 105: 20167-20172 (2008), содержание каждого из которых включено в данный документе в качестве ссылки в полном объеме. Например, слитые белки DDpp могут содержать фрагмент или домен антитела, который содержит одну или более из следующих модификаций, которые уменьшают КЗЦ: IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG2-118-260; IgG4- 261-447; IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A; IgG1-L234F, L235E, P331S и IgG1-C226S, p260S; где нумерация остатков соответствует нумерации индекса EU Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition, содержание которого полностью включено в данное описание посредством ссылки).

[0200] Период полужизни IgG опосредуется его pH-зависимым связыванием с неонатальным рецептором FcRn. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность эффекторного домена иммуноглобулина или производного эффекторного домена иммуноглобулина, который обеспечивает слитому белку DDpp способность связывать неонатальный рецептор FcRn. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность связывающего FcRn домена иммуноглобулина, которая была модифицирована для усиления связывания с FcRn (см., например, Petkova et al., Int. Immunol. 18: 1759-1769 (2006); Dall'Acqua et al., J. Immunol. 169: 5171-5180 (2002); Oganessian et al., Mol. Immunol. 46: 1750-1755 (2009); Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281: 23514-23524 (2006); Hinton et al., J. Immunol. 176: 346-356 (2006); Datta-Mannan et al., Drug Metab. Dispos. 35: 86-94 (2007); Datta-Mannan et al., J. Biol. Chem. 282: 1709-1717 (2007); WO06/130834; Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20: 685-691 (2009) и Yeung et al., J. Immunol. 182: 7663-7671 (2009), содержание каждого из которых включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

[0201] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, который был модифицирован, чтобы иметь селективную аффинность с FcRn при pH 6,0, но не pH 7,4. Например, слитые белки DDpp могут содержать фрагмент или домен антитела, который содержит одну или более из следующих модификаций, которые увеличивают период полужизни: IgG1-M252Y, S254T, T256E; IgG1-T250Q, M428L; IgG1-H433K, N434Y; IgG1-N434A и IgG1-T307A, E380A, N434A; где нумерация остатков соответствует нумерации индекса EU Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition, содержание которого полностью включено в данное описание посредством ссылки).

[0202] В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была

модифицирована для уменьшения связывания с FcRn (см., например, Petkova et al., *Int. Immunol.* 18: 1759-1769 (2006); Datta-Mannan et al., *Drug Metab. Dispos.* 35: 86-94 (2007); Datta-Mannan et al., *J. Biol. Chem.* 282: 1709-1717 (2007); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20: 685-691 (2009) и Vaccaro et al., *Nat. Biotechnol.* 23: 1283-1288 (2005), содержание каждого из которых включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме. Например, слитые белки DDpp могут содержать фрагмент или домен антитела, который содержит одну или более из следующих модификаций, которые уменьшает период полужизни: IgG1-M252Y, S254T, T256E; H433K, N434F, 436H; IgG1-I253A; и IgG1-P257I, N434H и D376V, N434H; где нумерация остатков соответствует нумерации индекса EU Kabat et al. (Kabat et al., *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, содержание которого полностью включено в данное описание посредством ссылки).

[0203] Согласно другому варианту осуществления, слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, соответствующую эффекторному домену иммуноглобулина, который был модифицирован, чтобы содержать по меньшей мере одну замену в своей последовательности, соответствующую положению области Fc (например, гамма-Fc), выбранной из группы, состоящей из: 238, 239, 246, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 и 439, где нумерация остатков в области Fc соответствует системе нумерации EU из Kabat et al. (Kabat et al., *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition, содержание которого полностью включено в данное описание посредством ссылки). В конкретном варианте осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность производного эффекторного домена иммуноглобулина, где по меньшей мере один остаток, соответствующий положению 434, представляет собой остаток, выбранный из группы, состоящей из: A, W, Y, F и H. В соответствии с другим вариантом осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность производного эффекторного фрагмента иммуноглобулина, имеющую следующие соответствующие замены S298A/E333A/K334A. В дополнительном варианте осуществления слитый белок DDpp содержит производное эффекторного домена иммуноглобулина, имеющее замену, соответствующую K322A. В другом варианте осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность производного эффекторного домена иммуноглобулина, имеющую одну или любую комбинацию из следующих замен K246H, H268D, E283L, S324G, S239D и I332E. Согласно еще одному варианту осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность производного эффекторного домена иммуноглобулина, имеющую замены,

соответствующие D265A/N297A.

[0204] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит последовательность эффекторного домена иммуноглобулина, которая была гликоинженерирована или мутирована для увеличения эффекторной функции с использованием методов, известных в данной области техники. Например, инактивация (посредством точечных мутаций или других средств) последовательности домена константной области, содержащейся в DDpp, может снижать связывание Fc-рецептора циркулирующего слитого белка DDpp, тем самым увеличивая локализацию опухоли. В других случаях может быть так, что модификации константной области, согласующиеся с определенными предложенными вариантами осуществления, обеспечивают умеренное связывание комплемента и, таким образом, уменьшают период полужизни в сыворотке и неспецифическую ассоциацию конъюгированного цитотоксина. Еще другие модификации константной области могут быть использованы для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных фрагментов, которые обеспечивают улучшенную локализацию благодаря повышенной специфичности антигена или гибкости антител. Результирующий физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты модификаций, такие как локализация опухоли, биораспределение и период полужизни в сыворотке, могут быть легко измерены и количественно определены с использованием хорошо известных иммунологических методов без ненужных экспериментов.

[0205] В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка содержит рецептор клеточной поверхности для иммуноглобулина или другой пептид-связывающей молекулы, такой как рецептор для константной области иммуноглобулина, и включает класс рецепторов, обычно называемых «Fc-рецепторами» («FcR»). Ряд FcR был структурно и/или функционально охарактеризован и известен в данной области техники, включая FcR, обладающий специфическими способностями взаимодействовать с ограниченным подмножеством изотипов тяжелой цепи иммуноглобулина, или которые взаимодействуют с доменами Fc с различной аффинностью, и/или которые могут быть экспрессированы на ограниченных подмножествах иммунных эффекторных клеток при определенных условиях (например, Kijimoto-Ochichai et al., *Cell Mol. Life. Sci.* 59: 648 (2002); Davis et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 266: 85 (2002); Pawankar, *Curr. Opin. Allerg. Clin. Immunol.* 1: 3 (2001); Radaev et al., *Mol. Immunol.* 38: 1073 (2002); Wurzburg et al., *Mol. Immunol.* 38: 1063 (2002); Sulica et al., *Int. Rev. Immunol.* 20: 371 (2001); Underhill et al., *Ann. Rev. Immunol.* 20: 825 (2002); Coggeshall, *Curr. Dir. Autoimm.* 5: 1 (2002); Mimura et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 495: 49 (2001); Baumann et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 495: 219 (2001); Santoso et al., *Ital. Heart J.* 2: 811 (2001); Novak et al., *Curr. Opin. Immunol.* 13:

721 (2001); Fossati et al., Eur. J. Clin. Invest. 31: 821 (2001)); содержание каждого из которых включено в данный документе в качестве ссылки в полном объеме.

[0206] Клетки, которые способны опосредовать АЗКЦ, являются примерами иммунных эффекторных клеток. Другие иммунные эффекторные клетки включают естественные клетки-киллеры, инфильтрирующие опухоль Т-лимфоциты (ТНЛ), цитотоксические Т-лимфоциты и гранулоцитарные клетки, такие как клетки, которые содержат механизмы аллергического ответа. Таким образом, иммунные эффекторные клетки включают, без ограничения, клетки гематопозитического происхождения, включая клетки на различных стадиях дифференцировки в миелоидных и лимфоидных линиях и которые могут (но не обязательно) экспрессировать один или более типов FcR функциональной клеточной поверхности, таких как Т лимфоциты, В-лимфоциты, НК-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, эритроциты и предшественники, предшественники (например, гематопозитические стволовые клетки), а также покоящиеся, активированные и зрелые формы таких клеток. Другие иммунные эффекторные клетки могут включать клетки негематопозитического происхождения, которые способны опосредовать иммунные функции, например, эндотелиальные клетки, кератиноциты, фибробласты, остеокласты, эпителиальные клетки и другие клетки. Иммунные эффекторные клетки могут также включать клетки, которые опосредуют цитотоксические или цитостатические события, или эндоцитические, фагоцитарные или пиноцитотические события, или которые влияют на индукцию апоптоза, или которые влияют на микробный иммунитет или нейтрализацию микробной инфекции, или клетки, которые опосредуют аллергическую, воспалительную, гиперчувствительность и/или аутоиммунные реакции.

Слитые белки DDpp с увеличенным периодом полужизни

[0207] Раскрытый DDpp может быть слит или образовывать комплекс со вторым пептидным доменом, увеличивающим время полужизни или стабильность DDpp.

[0208] В одном аспекте DDpp дополнительно содержит одну или более аминокислот, которые облегчают синтез, обработку или использование пептида, включая, без ограничения, один или два лизина на N-конце и/или C-конце для увеличения растворимости полипептида. Подходящие слитые белки включают, без ограничения, белки, содержащие DDpp, связанный с одним или более полипептидами, полипептидными фрагментами или аминокислотами, которые обычно не считаются частью последовательности белка. В одном аспекте слитый пептид содержит полные аминокислотные последовательности двух или более пептидов или, альтернативно, содержит части (фрагменты) двух или более пептидов. В некоторых аспектах пептид

(например, белок S-связывающий пептид) функционально связан, например, с одним или более из следующих компонентов: маркерный белок, пептид, который облегчает очистку, пептидная последовательность, которая способствует образованию мультимерных белков, или фрагмент любого из вышеперечисленного. Подходящие партнеры по слиянию включают, без ограничения, His-метку, FLAG-метку, strep-метку и тус-метку.

[0209] В некоторых вариантах осуществления DDpp слит с одним или более фрагментами, которые увеличивают период полужизни полипептида. Период полужизни может быть увеличен, например, путем увеличения молекулярной массы DDpp, чтобы избежать почечного клиренса и/или включения связывающего домена для FcRn-опосредованного пути рециркуляции. В одном варианте осуществления DDpp слит или химически конъюгирован с полипептидом альбумина или его фрагментом (например, сывороточным альбумином человека (HSA)). В конкретных вариантах осуществления слитый или химически конъюгированный фрагмент альбумина содержит 10 %, 25 %, 50 % или 75 % полноразмерного белка альбумина. В дополнительных или альтернативных вариантах осуществления DDpp сливается или образует комплекс с альбумин-связывающим доменом или жирной кислотой, которая связывает альбумин при введении *in vivo*. Примером альбумин-связывающего домена является «albu-метка», фрагмент, полученный из 4-(п-йодфенил)-бутановой кислоты (Dumelin et al., *Angew Chem. Int. Ed Engl.* 47: 3196–3201 (2008)).

[0210] В одном варианте осуществления DDpp слит или химически конъюгирован с полипептидом трансферрина или его фрагментом (например, человеческим трансферрином). В конкретных вариантах осуществления слитый или химически конъюгированный фрагмент трансферрина содержит 10 %, 25 %, 50 % или 75 % полноразмерного белка трансферрина. В дополнительных или альтернативных вариантах осуществления DDpp сливается или образует комплекс с доменом, связывающим трансферрин, который связывает трансферрин при введении *in vivo*.

[0211] В некоторых вариантах осуществления DDpp слит или химически конъюгирован с пролин-аланин-сериновым мультимером (PASylation; XL-Protein GmbH), неточной повторяющейся пептидной последовательностью (XTENylation, rPEG), гомополимером остатков глицина (HAPylation), эластиноподобные повторяющиеся последовательности (последовательности) (ELPylation; см., например, заявку на патент США Appl. № 61/442,106, содержание которой полностью включено в данное описание посредством ссылки), искусственный GLK (слитый GLK; Huang et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72: 435–41 (2010)), или пептид СТР из бета-субъединицы СG человека (слитый СТР).

Дополнительные слитые белки DDpp

[0212] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp специфически связывает BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP и/или p26 AFP и дополнительно связывает связанный с заболеванием антиген. Связанный с заболеванием антиген может быть антигеном, характерным для рака и/или определенного типа клеток (например, гиперпролиферативной клетки) и/или патогена (например, бактериальной клетки (например, туберкулеза, оспы и сибирской язвы), вируса (например, ВИЧ), паразита (например, малярии и лейшманиоза), антигеном грибковой инфекции, микромицета, микоплазмы, прионным антигеном или антигеном, связанным с нарушением иммунной системы. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp конъюгирован с терапевтическим или цитотоксическим агентом.

[0213] В дополнительном варианте осуществления слитый белок DDpp связан с одной или более химическими составляющими (например, метками), которые облегчают обнаружение, мультимеризацию, связывание с партнером по взаимодействию или характеристику активности DDpp. Типичным химическим фрагментом является биотин. Другие фрагменты, подходящие для конъюгации с DDpp, включают, но не ограничиваются ими, фотосенсибилизатор, краситель, флуоресцентный краситель, радионуклид, радионуклидсодержащий комплекс, фермент, токсин и цитотоксический агент. Фотосенсибилизаторы включают, например, фотофрин, Visudyne, Levulan, Foscan, Metvix, Hexvix®, Cysview™, Laserphyrin, Antrin, Photochlor, Photosens, Photrex, Lumacan, Sevira, Visonac, BF-200 ALA и Amphinex. В дополнительных вариантах осуществления His-метка, FLAG-метка, strep-метка или mус-метка сопряжены с DDpp.

[0214] В другом варианте осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который связывает BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP, p26 AFP или их фрагмент и дополнительно связывает пептидную метку, присутствующую на представляющей интерес мишени. Такие пептидные метки обеспечивают полезное средство для обнаружения и/или прикрепления интересующих мишеней, содержащих пептидные метки. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp специфически связывает пептидную метку, выбранную из группы: гексагистидильная (His6) метка, mус-метка или FLAG-метка. Другие пептидные метки описаны в данном документе или иным образом известны в данной области техники.

Слитые белки DDpp с эпитопной меткой

[0215] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит пептидную эпитопную метку. В некоторых вариантах осуществления пептидную метку

выбирают из группы, состоящей из гексагистидильной (His6) метки, тус-метки и FLAG-метки. В дополнительных вариантах осуществления пептидные метки включают, без ограничения, ави-метку (обеспечивает биотинилирование метки и выделение стрептавидином), кальмодулин, E-метку, гемагглютинин (HA), S-метку, SBP-метку, sof-метку 1, стрептавидин тетра или полицистеин, V5, VSV и Xpress-метку. Кроме того, могут быть использованы полигистидильные метки (отличные от 6 остатков). В дополнительных вариантах осуществления могут быть использованы ковалентные пептидные метки, белковые метки и тому подобное. Ковалентные пептидные метки включают, без ограничения, isoper-метка (ковалентно связывается с белком pilinC), Spy-метка (ковалентно связывается с белком SpyCatcher) и Snoop-метка (ковалентно связывается с белком SnoopCatcher). В дополнительных вариантах осуществления необязательно могут быть использованы белковые метки, включая, без ограничения, биотин-карбоксильный белок-носитель (BCCP), глутатион-s-трансферазу, зеленый флуоресцентный белок (или другой флуорофор), Halo-метку, Nus-метку, тиоредоксин и Fc-метки. В дополнительных вариантах осуществления могут использоваться несколько типов меток. В дополнительных вариантах осуществления метки не используются. В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит удаляемую метку. Может быть использована любая комбинация внеклеточных, трансмембранных и внутриклеточных доменов, раскрытых в данном документе, в зависимости от варианта осуществления.

Линкеры DDpp

[0216] Термины «линкер» и «спейсер» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения пептидной или другой химической связи, которая функционирует для связывания в противном случае независимых функциональных доменов. В одном варианте осуществления линкер в DDpp расположен между DDpp и другим полипептидным компонентом, содержащим независимый в остальном функциональный домен. Подходящие линкеры для связывания двух или более связанных DDpp будут понятны специалистам в данной области техники и обычно могут быть любым линкером, используемым в данной области техники для связывания пептидов, белков или других органических молекул. В конкретных вариантах осуществления такой линкер подходит для конструирования белков или полипептидов, которые предназначены для фармацевтического применения.

[0217] Подходящие линкеры для функционального связывания DDpp и дополнительного компонента слитого белка DDpp в одноцепочечной аминокислотной последовательности включают, без ограничения, полипептидные линкеры, такие как

глициновые линкеры, сериновые линкеры, смешанные глицин/сериновые линкеры, богатые глицином и серином линкеры или линкеры, состоящие в основном из полярных полипептидных фрагментов.

[0218] В одном варианте осуществления линкер состоит из большинства аминокислот, выбранных из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. В одном варианте осуществления линкер состоит из большинства аминокислот, выбранных из глицина, аланина, пролина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, треонина, глутамина и лизина. В одном варианте осуществления линкер слитого белка DDpp состоит из одной или более аминокислот, выбранных из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. В одном варианте осуществления линкер слитого белка DDpp состоит из одной или более аминокислот, выбранных из глицина, аланина, пролина, аспарагина, аспартата, треонина, глутамина и лизина. В другом варианте осуществления линкер слитого белка DDpp состоит из большинства аминокислот, которые являются стерически незатрудненными. В другом варианте осуществления раскрыт линкер, в котором большинство аминокислот представляют собой глицин, серин и/или аланин. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер выбирают из полиглицинов (таких как (Gly)₅ (SEQ ID NO: 975) и (Gly)₈ (SEQ ID NO: 976), поли(Gly-Ala), и полиаланины. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Asp-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 5).

[0219] В одном варианте осуществления слитый DDpp содержит DDpp, непосредственно присоединенный (т.е. без линкера) к другому компоненту слитого белка DDpp. В одном варианте осуществления слитый DDpp содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, DDpp, непосредственно присоединенный к другому компоненту слитого DDpp.

[0220] В другом варианте осуществления DDpp может быть функционально связан с другим компонентом слитого белка DDpp через линкер. Слитые белки DDpp могут содержать один линкер, несколько линкеров или не содержат линкеров. В одном варианте осуществления слитый DDpp содержит DDpp, функционально связанный с другим компонентом слитого белка DDpp через линкерный пептид. В одном варианте осуществления слитый DDpp содержит по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 DD функционально связанных с другим компонентом слитого белка DDpp через линкерный пептид.

[0221] Линкеры могут быть любого размера или состава, если они способны оперативно связывать DDpp таким образом, который позволяет DDpp связывать

представляющую интерес мишень, такую как BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP. В некоторых вариантах осуществления линкеры составляют от около 1 до около 100 аминокислот, от около 1 до 50 аминокислот, от около 1 до 20 аминокислот, от около 1 до 15 аминокислот, от около 1 до 10 аминокислот, от около 1 до 5 аминокислот кислоты, около от 2 до 20 аминокислот, около от 2 до 15 аминокислот, около от 2 до 10 аминокислот или около от 2 до 5 аминокислот. Должно быть понятно, что длина, степень гибкости и/или другие свойства линкера(ов) могут иметь некоторое влияние на свойства предложенных белков, содержащих DD, включая, без ограничения, аффинность, специфичность или avidность для представляющей интерес мишени или одного или более других белков-мишеней, представляющих интерес. Когда два или более линкера используются в слитых белках DDpp, эти линкеры могут быть одинаковыми или разными. В контексте и раскрытии, предложенном в данном документе, специалист в данной области техники сможет регулярно определять оптимальную композицию и длину линкера с целью функционального связывания DDpp и других компонентов слитого белка DDpp.

[0222] Линкер также может представлять собой непептидный линкер, такой как алкильный линкер или ПЭГ-линкер. Например, могут быть использованы алкильные линкеры, такие как $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_s\text{-C(0)-}$, где $s = 2\text{-}20$. Эти алкильные линкеры могут быть дополнительно замещены любой не стерически затрудненной группой, такой как низший алкил, например, C1-C6) низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH₂, фенил, и т.д. Иллюстративный непептидный линкер представляет собой ПЭГ-линкер. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-линкер имеет молекулярную массу от около 100 до 5000 кДа или от около 100 до 500 кДа.

[0223] Подходящие линкеры для связывания компонентов слитого белка DDpp путем химического сшивания включают, без ограничения, гомобифункциональные химические сшивающие соединения, такие как глутаровый альдегид, имидоэфиры, такие как диметиладипимидат (DMA), диметилсуберимидат (DMS) и диметилпимелимидат (DMP) или N-гидроксисукцинимид (NHS), такие как дитиобис (сукцинимидилпропионат) (DSP) и дитиобис (сульфосукцини-мидилпропионат) (DTSSP). Примеры подходящих линкеров для связывания компонентов слитого белка DDpp гетеро-бифункциональных реагентов для перекрестного сшивания включают, без ограничения, сшивающие линкеры с одним аминокрепительным концом и сульфгидрильно-реактивным фрагментом на другом конце или с эфиром NHS на одном конце и SH-реактивной группой (например, малеимид или пиридил).

[0224] В дополнительных вариантах осуществления один или более линкеров в

слитом белке DDpp являются расщепляемыми. Примеры расщепляемых линкеров включают, без ограничения, последовательность пептида, распознаваемую протеазами (in vitro или in vivo) различного типа, такими как T_{ev}, тромбин, фактор Ха, плазмин (протеазы крови), металлопротеазы, катепсины (например, GFLG, и т.д.), и протеазы, найденные в других компартментах тела.

[0225] В одном варианте осуществления линкер представляет собой «расщепляемый линкер», который облегчает высвобождение DDpp или цитотоксического агента в клетке. Например, кислотолабильный линкер (например, гидразон), протеазочувствительный (например, чувствительный к пептидазе) линкер, фотолабильный линкер, диметильный линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari, Can. Res. 52: 127-131 (1992); патент США № 5208020, публ. заявки США публикации № 20090110753; содержимое каждого из которых включено в данное описание в качестве ссылки в полном объеме) может использоваться, когда желательно, чтобы ковалентное присоединение между DDpp или цитотоксическим агентом и партнером по слиянию внутриклеточно расщеплялось, когда композиция интернализуется в клетку. Термины «внутриклеточно расщепляемый» и «внутриклеточное расщепление» относятся к метаболическому процессу или реакции внутри клетки на конъюгат лекарственное средство-DDpp, в результате чего ковалентное прикрепление, то есть связывание через линкер между DDpp и цитотоксическим агентом, DDpp и партнером по слиянию, или между двумя DDpp приводит к высвобождению DDpp, и/или цитотоксического агента, диссоциированных внутри клетки.

[0226] Оптимизация линкера может быть оценена с использованием методик, описанных в данном документе и/или иным образом известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления линкеры не нарушают способность DDpp связывать молекулу-мишень и/или другой компонент слитого белка DDpp, такой как домен или фрагмент антитела, связывать антиген.

DDpp как химические конъюгаты

[0227] Слитые белки DDpp, которые способствуют специфическому связыванию с представляющими интерес мишенями, могут быть химически конъюгированы с различными соединениями, такими как флуоресцентные красители, радиоизотопы, хроматографические композиции (например, шарики, смолы, гели и т.д.) и химиотерапевтические агенты. Конъюгаты DDpp имеют применение, которое включает, без ограничения, диагностические, аналитические, производственные и терапевтические применения.

[0228] Присущий недостаток цистеинов в последовательности DD обеспечивает

возможность введения уникальных цистеинов для целей сайт-специфической конъюгации.

[0229] В некоторых вариантах осуществления DDpp (например, слитый белок DDpp) содержит по меньшей мере один реактивный остаток. Реактивные остатки применимы, например, в качестве сайтов для присоединения конъюгатов, таких как химиотерапевтические препараты. Реакционноспособным остатком может быть, например, цистеин, лизин или другой реакционноспособный остаток. Таким образом, цистеин может быть добавлен к DDpp на N- или C-конце или в последовательности DDpp. Цистеин может быть заменен другой аминокислотой в последовательности DDpp. Кроме того, лизин может быть добавлен к DDpp на любом конце или в последовательности DDpp, и/или лизин может быть заменен другой аминокислотой в последовательности DDpp. В одном варианте осуществления реакционноспособный остаток (например, цистеин, лизин и т.д.) расположен в последовательности петли DD (например, аминокислотные остатки 22-24 и 46-49 SEQ ID NOS: 11-949 и 950). В одном варианте осуществления реактивный остаток расположен между компонентами слитого белка DDpp, например, в линкере, расположенном между DDpp и другим компонентом слитого белка DDpp. Реактивный остаток (например, цистеин, лизин и т.д.) также может быть расположен в последовательности DDpp или другого компонента слитого белка DDpp. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp или DDpp содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три реакционноспособных остатка. В одном варианте осуществления DDpp такой, как слитый белок DDpp содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два или по меньшей мере три остатка цистеина.

DDpp, связывающий ВСМА

[0230] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфически связывает ВСМА. В других вариантах осуществления DD DDpp специфически связывает ВСМА, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления связывающий ВСМА DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306.

[0231] В некоторых вариантах осуществления связывающий ВСМА DDpp содержит множество доменов связывания мишени, которые связывают одну мишень (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые специфически связывают ВСМА и которые

имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые имеют одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые специфически связываются с различными эпитопами ВСМА и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает ВСМА и дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 дополнительных различных DD или доменов связывания мишени (например, scFv), которые специфически связываются с ВСМА или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает ВСМА (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306), и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности В-клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает ВСМА (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306), и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает ВСМА (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает ВСМА (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает ВСМА (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает ВСМА (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток.

[0232] В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит вариант раскрытого в данном документе связывающего ВСМА DD (эталонный DD), который сохраняет способность специфически связывать ВСМА. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего ВСМА DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен по сравнению с эталонным связывающим ВСМА DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего ВСМА DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен по сравнению с эталонным связывающим ВСМА DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего ВСМА DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен по сравнению с эталонным связывающим ВСМА DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306.

[0233] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего ВСМА DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего ВСМА DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего ВСМА DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного ВСМА-DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего ВСМА DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего ВСМА DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306.

[0234] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего ВСМА DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34,

36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного связывающего ВСМА DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего ВСМА DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего ВСМА DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306.

[0235] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен связывающий ВСМА DDpp, который полностью или частично (например, перекрывается с эпитопом) блокирует связывание эталонного DD с ВСМА, причем эталонный DD имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления в данном изобретении предложен связывающий ВСМА DDpp, который связывается с тем же эпитопом ВСМА, что и эталонный DD, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 11-305 и 306.

[0236] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает ВСМА. В некоторых вариантах осуществления DD специфически связывает белок ВСМА, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp, связывающий ВСМА, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело или часть (фрагмент) антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело, которое специфически связывается с раковым антигеном. В других вариантах осуществления DDpp содержит коммерчески одобренное терапевтическое антитело

(например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, вельтузумаб, MEDI-551, эспратузумаб, белимумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN882). В других вариантах осуществления связывающий ВСМА DDpp представляет собой слитый белок Fc. В других вариантах осуществления белок Fc содержит вариант домена Fc человека.

[0237] В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит связывающий ВСМА DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит AFP или p26 AFP или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит AFP (например, SEQ ID NO: 9) или их фрагмента. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит p26 AFP (SEQ ID NO: 10) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 10, 968, 969, 970, 971, 972, 973 или 974. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент белка сыворотки или антигенный фрагмент белка сыворотки (например, AFP и p26 AFP). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот сывороточного белка.

[0238] В некоторых вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен CD123 (SEQ ID NO: 8) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, VTLA, DR3, CD37, TSLPR, IL7R и gp96, или их фрагмента.

[0239] В некоторых вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок

DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот внеклеточного домена рецептора клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена ВСМА (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена ВСМА (SEQ ID NO: 7), CD123 (SEQ ID NO: 8) или CS1 (SEQ ID NO: 965). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96.

[0240] В дополнительных вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В других вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306. В некоторых вариантах осуществления связывающий ВСМА слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков внутриклеточного белка (например, ядерного белка).

DDpp, связывающий CD123

[0241] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфически связывает CD123. В других вариантах осуществления DD специфически связывает CD123, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 307-739 и 740.

[0242] В некоторых вариантах осуществления связывающий CD123 DDpp содержит множество доменов связывания мишени, которые связывают одну мишень (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые специфически связывают CD123 и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые имеют одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые специфически

связываются с различными эпитопами CD123 и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CD123 и дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 дополнительных различных DD или доменов связывания мишени (например, scFv), которые специфически связываются с CD123 или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CD123 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740), и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности В-клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CD123 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740), и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CD123 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CD123 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CD123 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CD123 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток.

[0243] В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит вариант раскрытого в данном документе связывающего CD123 DD (эталонный DD), который сохраняет способность специфически связывать CD123. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CD123 DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или

10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен по сравнению с эталонным связывающим CD123 DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CD123 DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен по сравнению с эталонным связывающим CD123 DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CD123 DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен по сравнению с эталонным связывающим CD123 DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740.

[0244] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CD123 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего CD123 DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CD123 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного CD123-DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CD123 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего CD123 DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740.

[0245] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CD123 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного связывающего CD123 DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CD123 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-

5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CD123 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740.

[0246] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен связывающий CD123 DDpp, который полностью или частично (например, перекрывается с эпитопом) блокирует связывание эталонного DD с CD123, причем эталонный DD имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления в данном изобретении предложен связывающий CD123 DDpp, который связывается с тем же эпитопом CD123, что и эталонный DD, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 307-739 и 740.

[0247] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает CD123. В некоторых вариантах осуществления DD слитого белка DDpp специфически связывает CD123, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело или часть (фрагмент) антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело, которое специфически связывается с раковым антигеном. В других вариантах осуществления DDpp содержит коммерчески одобренное терапевтическое антитело (например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, вельтузумаб, MEDI-551, эпратузумаб, белимумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN882). В других вариантах осуществления связывающий CD123 DDpp представляет собой слитый белок Fc.

[0248] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый

белок, содержащий связывающий CD123 DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp связывающий CD123 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит весь или часть человеческого сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит AFP (SEQ ID NO: 9) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит р26 AFP (SEQ ID NO: 10) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 10, 968, 969, 970, 971, 972, 973 или 974. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент белка сыворотки или антигенный фрагмент белка сыворотки (например, AFP и р26 AFP). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот сывороточного белка.

[0249] В некоторых вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен CD123 (SEQ ID NO: 8) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37, TSLPR, IL7R и gp96, или их фрагмента.

[0250] В некоторых вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот внеклеточного домена рецептора клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена CD123 (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит

фрагмент внеклеточного домена CS1 (SEQ ID NO: 965). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96.

[0251] В дополнительных вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В других вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740. В некоторых вариантах осуществления связывающий CD123 слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков внутриклеточного белка (например, ядерного белка).

DDpp, связывающий CS1

[0252] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфически связывает CS1. В других вариантах осуществления DD специфически связывает CS1, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 965. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910.

[0253] В некоторых вариантах осуществления связывающий CS1 DDpp содержит множество доменов связывания мишени, которые связывают одну мишень (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые специфически связывают CS1 и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые имеют одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые специфически связываются с различными эпитопами CS1 и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CS1 и дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 дополнительных

различных DD или доменов связывания мишени (например, scFv), которые специфически связываются с CS1 или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CS1 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910), и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности В-клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CS1 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910), и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CS1 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CS1 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CS1 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает CS1 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток.

[0254] В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит вариант раскрытого в данном документе связывающего CS1 DD (эталонный DD), который сохраняет способность специфически связывать CS1. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CS1 DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен по сравнению с эталонным связывающим CS1 DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CS1 DD содержит 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен по сравнению с эталонным связывающим CS1 DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CS1 DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен по сравнению с эталонным связывающим CS1 DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910.

[0255] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CS1 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего CS1 DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CS1 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного CS1-DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CS1 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего CS1 DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910.

[0256] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CS1 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного связывающего CS1 DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CS1 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего CS1 DD содержит в общей

сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910.

[0257] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен связывающий CS1 DDpp, который полностью или частично (например, перекрывается с эпитопом) блокирует связывание эталонного DD с CS1, причем эталонный DD имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления в данном изобретении предложен связывающий CS1 DDpp, который связывается с тем же эпитопом CS1, что и эталонный DD, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 896-909 и 910.

[0258] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает CS1. В некоторых вариантах осуществления DD слитого белка DDpp специфически связывает CS1, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 965. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело или часть (фрагмент) антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело, которое специфически связывается с раковым антигеном. В других вариантах осуществления DDpp содержит коммерчески одобренное терапевтическое антитело (например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, вельтузумаб, MEDI-551, эпратузумаб, белимумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN882). В других вариантах осуществления связывающий CS1 DDpp представляет собой слитый белок Fc.

[0259] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий связывающий CS1 DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp связывающий CS1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из

группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит весь или часть человеческого сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит AFP (SEQ ID NO: 9) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит р26 AFP (SEQ ID NO: 10) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 10, 968, 969, 970, 971, 972, 973 или 974. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент белка сыворотки или антигенный фрагмент белка сыворотки (например, AFP и р26 AFP). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот сывороточного белка.

[0260] В некоторых вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен CS1 (SEQ ID NO: 965) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37, TSLPR, IL7R и gp96, или их фрагмента.

[0261] В некоторых вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот внеклеточного домена рецептора клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена CD123 (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена CS1 (SEQ ID NO: 965). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96.

[0262] В дополнительных вариантах осуществления связывающий CS1 слитый

белок DDpp содержит внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В других вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910. В некоторых вариантах осуществления связывающий CS1 слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков внутриклеточного белка (например, ядерного белка).

DDpp, связывающий HER2

[0263] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфически связывает HER2. В других вариантах осуществления DD специфически связывает HER2, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 967. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950.

[0264] В некоторых вариантах осуществления связывающий HER2 DDpp содержит множество доменов связывания мишени, которые связывают одну мишень (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые специфически связывают HER2 и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые имеют одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые специфически связываются с различными эпитопами HER2 и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает HER2 и дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 дополнительных различных DD или доменов связывания мишени (например, scFv), которые специфически связываются с HER2 или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает HER2 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950), и дополнительно содержит один или более дополнительных

DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает HER2 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950), и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает HER2 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает HER2 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает HER2 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает HER2 (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток.

[0265] В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит вариант раскрытого в данном документе связывающего HER2 DD (эталонный DD), который сохраняет способность специфически связывать HER2. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего HER2 DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен по сравнению с эталонным связывающим HER2 DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего HER2 DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен по сравнению с эталонным связывающим HER2 DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего HER2 DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен по сравнению с эталонным связывающим

HER2 DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950.

[0266] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего HER2 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего HER2 DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего HER2 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного HER2-DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего HER2 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего HER2 DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950.

[0267] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего HER2 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного связывающего HER2 DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего HER2 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего HER2 DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 911-949 и 950.

[0268] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен связывающий HER2 DDpp, который полностью или частично (например, перекрывается с эпитопом) блокирует связывание эталонного DD с HER2, причем эталонный DD имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления в данном изобретении предложен связывающий HER2 DDpp, который связывается с тем же эпитопом HER2, что и эталонный DD, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 911-949 и 950.

[0269] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает HER2. В некоторых вариантах осуществления DD слитого белка DDpp специфически связывает HER2, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 967. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело или часть (фрагмент) антитела. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело, которое специфически связывается с раковым антигеном. В других вариантах осуществления DDpp содержит коммерчески одобренное терапевтическое антитело (например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, вельтузумаб, MEDI-551, эпратузумаб, белимумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN882). В других вариантах осуществления связывающий HER2 DDpp представляет собой слитый белок Fc.

[0270] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий связывающий HER2 DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp связывающий HER2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит весь или часть человеческого сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит AFP (SEQ ID NO: 9) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления

связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит p26 AFP (SEQ ID NO: 10) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 10, 968, 969, 970, 971, 972, 973 или 974. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент белка сыворотки или антигенный фрагмент белка сыворотки (например, AFP и p26 AFP). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот сывороточного белка.

[0271] В некоторых вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен HER2 (SEQ ID NO: 967) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37, TSLPR, IL7R и gp96, или их фрагмента.

[0272] В некоторых вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот внеклеточного домена рецептора клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена CD123 (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена CS1 (SEQ ID NO: 965). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96.

[0273] В дополнительных вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В других вариантах осуществления

связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950. В некоторых вариантах осуществления связывающий HER2 слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков внутриклеточного белка (например, ядерного белка).

DDpp, связывающий AFP

[0274] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфически связывает AFP или его фрагмент. В других вариантах осуществления DD DDpp специфически связывает AFP, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 9, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В дополнительных вариантах осуществления связывающий AFP DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895.

[0275] В некоторых вариантах осуществления связывающий AFP DDpp содержит множество доменов связывания мишени, которые связывают одну мишень (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые специфически связывают AFP и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые имеют одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые специфически связываются с различными эпитопами AFP и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP и дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 дополнительных различных DD или доменов связывания мишени (например, scFv), которые специфически связываются с AFP или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895), и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности В-клетки. В некоторых вариантах

осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895), и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает AFP (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток.

[0276] В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит вариант раскрытого в данном документе связывающего AFP DD (эталонный DD), который сохраняет способность специфически связывать AFP. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего AFP DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен по сравнению с эталонным связывающим AFP DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего AFP DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен по сравнению с эталонным связывающим AFP DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего AFP DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен по сравнению с эталонным связывающим AFP DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895.

[0277] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего AFP DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего AFP DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего AFP DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного AFP-DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего AFP DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего AFP DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895.

[0278] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего AFP DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного связывающего AFP DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего AFP DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего AFP DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895.

[0279] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен

связывающий AFP DDpp, который полностью или частично (например, перекрывается с эпитопом) блокирует связывание эталонного DD с AFP, причем эталонный DD имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 741 873 и 874. В других вариантах осуществления в данном изобретении предложен связывающий AFP DDpp, который связывается с тем же эпитопом AFP, что и эталонный DD, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 741 873 и 874.

[0280] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает AFP. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает AFP, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 9. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий связывающий AFP DD, который является вариантом DD, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895.

[0281] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает AFP, функционально связанный с полноразмерным антителом или частью (фрагментом) антитела. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок Fc. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело, которое специфически связывается с раковым антигеном. В других вариантах осуществления DDpp содержит коммерчески одобренное терапевтическое антитело (например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, вельтузумаб, MEDI-551, эспратузумаб, белилумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN882). В других вариантах осуществления связывающий AFP DDpp представляет собой слитый белок Fc.

[0282] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий связывающий AFP DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления связывающий AFP слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления слитый

белок DDpp содержит человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент белка сыворотки или антигенный фрагмент белка сыворотки. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот сывороточного белка.

[0283] В некоторых вариантах осуществления связывающий AFP слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления связывающий AFP слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления связывающий AFP слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8) или их фрагмента. В других вариантах осуществления связывающий AFP слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен BCMA (SEQ ID NO: 7), CD123 (SEQ ID NO: 8) или CS1 (SEQ ID NO: 965) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления связывающий AFP слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37, TSLPR, IL7R и gp96, или их фрагмента.

[0284] В некоторых вариантах осуществления связывающий AFP слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот внеклеточного домена рецептора клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8) или CS1 (SEQ ID NO: 965). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96.

[0285] В дополнительных вариантах осуществления связывающий AFP слитый белок DDpp содержит внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления

связывающий AFP слитый белок DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления связывающий AFP слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков внутриклеточного белка (например, ядерного белка).

DDpp, связывающий p26 AFP

[0286] В некоторых вариантах осуществления DD в DDpp специфически связывает p26 AFP. В других вариантах осуществления DD DDpp специфически связывает p26 AFP, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В дополнительных вариантах осуществления связывающий p26 AFP DDpp содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895.

[0287] В некоторых вариантах осуществления связывающий p26 AFP DDpp содержит множество доменов связывания мишени, которые связывают одну мишень (например, димеры, тримеры и т.д.). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые специфически связывают p26 AFP и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые имеют одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 DD, которые специфически связываются с различными эпитопами p26 AFP и которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает p26 AFP и дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 дополнительных различных DD или доменов связывания мишени (например, scFv), которые специфически связываются с p26 AFP или другим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает p26 AFP (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895), и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности В-клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает p26 AFP (например,

DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895), и дополнительно содержит один или более дополнительных DD или других доменов связывания мишени, связывающих один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает p26 AFP (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных мишеней. В других вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает p26 AFP (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает p26 AFP (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 различных раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит DD, который специфически связывает p26 AFP (например, DD, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895) и специфически связывает 2, 3, 4, 5 или более 5 раковых антигенов, экспрессируемых на поверхности различных раковых клеток.

[0288] В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит вариант раскрытого в данном документе связывающего p26 AFP DD (эталонный DD), который сохраняет способность специфически связывать p26 AFP. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего p26 AFP DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен по сравнению с эталонным связывающим p26 AFP DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего p26 AFP DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен по сравнению с эталонным связывающим p26 AFP DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего p26 AFP DD содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен по сравнению с эталонным связывающим p26 AFP DD, имеющим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895.

[0289] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта

связывающего p26 AFP DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего p26 AFP DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего p26 AFP DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего p26 AFP DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего p26 AFP DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам с 1-22, 29-46 и 52-72 эталонного связывающего p26 AFP DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895.

[0290] В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего p26 AFP DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных или неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного связывающего p26 AFP DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего p26 AFP DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 консервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта связывающего p26 AFP DD содержит в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, 1-3, 1-5 или 1-10 неконсервативных замен в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам: 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52-55, 57-59, 61, 62, 64-66 и 68-70, эталонного DD, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895.

[0291] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен связывающий p26 AFP DDpp, который полностью или частично (например, перекрывается

с эпитопом) блокирует связывание эталонного DD с p26 AFP, причем эталонный DD имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 741 873 и 874. В других вариантах осуществления в данном изобретении предложен связывающий p26 AFP DDpp, который связывается с тем же эпитопом p26 AFP, что и эталонный DD, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 741 873 и 874.

[0292] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает p26 AFP. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает p26 AFP, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 9. В других вариантах осуществления DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий связывающий p26 AFP DD, который является вариантом DD, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий DD, который специфически связывает p26 AFP, функционально связанный с полноразмерным антителом или частью (фрагментом) антитела. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок Fc. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4). В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит полноразмерное антитело, которое специфически связывается с раковым антигеном. В других вариантах осуществления DDpp содержит коммерчески одобренное терапевтическое антитело (например, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, вельтузумаб, MEDI-551, эпратузумаб, белимумаб, табалумаб, AMG-557, MEDI-570 и NN882). В других вариантах осуществления связывающий p26 AFP DDpp представляет собой слитый белок Fc. В других вариантах осуществления слитый белок Fc содержит вариант домена Fc человека.

[0293] В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой слитый белок, содержащий связывающий p26 AFP DD, функционально связанный с сывороточным белком. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp, связывающий p26 AFP, содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит человеческий сывороточный альбумин или

его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент белка сыворотки или антигенный фрагмент белка сыворотки. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот сывороточного белка.

[0294] В некоторых вариантах осуществления связывающий p26 AFP слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp, связывающий p26 AFP, содержит вариант аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления связывающий p26 AFP слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8) или их фрагмента. В других вариантах осуществления связывающий p26 AFP слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8) или CS1 (SEQ ID NO: 965) или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления связывающий p26 AFP слитый белок DDpp содержит внеклеточный домен рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37, TSLPR, IL7R и gp96, или их фрагмента.

[0295] В некоторых вариантах осуществления связывающий p26 AFP слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислот внеклеточного домена рецептора клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена BCMA (SEQ ID NO: 7) или CD123 (SEQ ID NO: 8) или CS1 (SEQ ID NO: 965). В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит фрагмент внеклеточного домена рецептора, выбранного из группы, состоящей из: CD19, CD20, CD22, HVEM, BTLA, DR3, CD37; TSLPR, IL7R и gp96.

[0296] В дополнительных вариантах осуществления связывающий p26 AFP слитый белок DDpp содержит внутриклеточный белок (например, ядерный белок) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp содержит DD, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp, связывающий p26 AFP, содержит вариант аминокислотной

последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 741-874 и 886-895. В некоторых вариантах осуществления связывающий р26 AFP слитый белок DDpp содержит фрагмент, состоящий из 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100 или 10-50 аминокислотных остатков внутриклеточного белка (например, ядерного белка).

[0297] Также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие DDpp и векторы, содержащие нуклеиновые кислоты. Также предложены клетки-хозяева (включая вирусные частицы), содержащие нуклеиновые кислоты и векторы. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую или эукариотическую клетку, которая презентует вариант DD на своей поверхности. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин презентует вариант DD на своей поверхности. В дополнительном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой фаг, который презентует вариант DD на своей поверхности. В дополнительном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой иммунную клетку человека, которая экспрессирует вариантный слитый белок DD на своей поверхности.

[0298] Агонист DDpp относится к DDpp, который каким-то образом увеличивает или усиливает биологическую активность мишени DDpp или обладает биологической активностью, сравнимой с известным агонистом мишени DDpp. В другом варианте осуществления DDpp является антагонистом мишени, которую он связывает. Антагонист DDpp относится к DDpp, который полностью или частично блокирует или каким-либо образом препятствует биологической активности белка-мишени DDpp или обладает биологической активностью, сравнимой с известным антагонистом или ингибитором белка-мишени DDpp.

[0299] Выражения, такие как «аффинность связывания с мишенью», «связывание с мишенью» и тому подобные, относятся к свойству полипептида, которое может быть непосредственно измерено посредством определения констант аффинности, например, количества DDpp, которое ассоциирует и диссоциирует при определенной концентрации антигена. Для характеристики молекулярного взаимодействия могут быть использованы различные методы, включая анализ конкуренции, анализ равновесия и микрокалориметрический анализ, а также анализ взаимодействия в реальном времени на основе поверхностно-плазмонного резонансного взаимодействия (например, с использованием прибора Biacore®). Эти способы известны специалисту в данной области техники и описаны, например, в Neri et al., *Tibtech* 14: 465-470 (1996) и Jansson et al., *J Biol Chem* 272: 8189-8197 (1997).

[0300] Требования к аффинности для данного события связывания DDpp зависят от

множества факторов, включая, без ограничения: состав и сложность матрицы связывания, валентность и плотность как DDpp, так и молекул-мишеней, а также функциональное применение DDpp. В одном варианте осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень (например, ВСМА, CD123, AFP или p26 AFP) с константой диссоциации (KD), меньшей или равной 5×10^{-3} М, 10^{-3} М, 5×10^{-4} М, 10^{-4} М, 5×10^{-5} М или 10^{-5} М. В дополнительном варианте осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень с KD, меньшей или равной 5×10^{-6} М, 10^{-6} М, 5×10^{-7} М, 10^{-7} М, 5×10^{-8} М или 10^{-8} М. В дополнительном варианте осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень с KD, меньшей или равной 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М, 10^{-12} М, 5×10^{-13} М, 10^{-13} М, 5×10^{-14} М, 10^{-14} М, 5×10^{-15} М или 10^{-15} М. В нескольких вариантах осуществления предложенный DDpp имеет константу диссоциации, выбранную из группы: от 10^{-4} М до 10^{-5} М, от 10^{-5} М до 10^{-6} М, от 10^{-6} М до 10^{-7} М, от 10^{-7} М до 10^{-8} М, от 10^{-8} М до 10^{-9} М, от 10^{-9} М до 10^{-10} М, от 10^{-10} М до 10^{-11} М и от 10^{-11} М до 10^{-12} М.

[0301] В некоторых вариантах осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень (например, ВСМА, CD123, AFP или p26 AFP) в активной форме. В одном варианте осуществления DDpp обратимо связывает представляющую интерес мишень в активной форме, а также освобождает связанную мишень в активной форме. В некоторых вариантах осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень в нативной форме. В конкретных вариантах осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень со скоростью диссоциации или K_{off} , большей или равной 10^{-10} сек⁻¹, 5×10^{-9} сек⁻¹, 10^{-9} сек⁻¹, 5×10^{-8} сек⁻¹, 10^{-8} сек⁻¹, 5×10^{-7} сек⁻¹, 10^{-7} сек⁻¹, 5×10^{-6} сек⁻¹, 10^{-6} сек⁻¹, 5×10^{-5} сек⁻¹, 10^{-5} сек⁻¹, 5×10^{-4} сек⁻¹, 10^{-4} сек⁻¹, 5×10^{-3} сек⁻¹, 10^{-3} сек⁻¹, 5×10^{-2} сек⁻¹, 10^{-2} сек⁻¹, 5×10^{-1} сек⁻¹ или 10^{-1} сек⁻¹.

[0302] Эксперименты по связыванию для определения KD и скорости диссоциации могут быть выполнены в ряде условий, включая, без ограничения, [pH 6,0, 0,01 % Tween 2], [pH 6,0, 0,1 % желатин], [pH 5,0, 0,01 % Tween 2], [pH 9,0, 0,1 % Tween 2], [pH 6,0, 15 % этиленгликоль, 0,01 % Tween 2], [pH 5,0, 15 % этиленгликоль, 0,01 % Tween 2] и [pH 9,0, 15 % этиленгликоль, 0,01 % Tween 2]. Буферы, в которых можно приготовить эти растворы, могут быть легко определены специалистом в данной области техники и в значительной степени зависят от желаемого pH конечного раствора. Растворы с низким pH (<pH 5,5) могут быть приготовлены, например, в цитратном буфере, буфере глицин-НСI или в буфере янтарной кислоты. Растворы с высоким pH можно приготовить, например, в трис-НСI, фосфатных буферах или бикарбонатных буферах натрия. Специалист в данной области техники обычно может использовать ряд условий для

определения KD и скоростей диссоциации с целью определения, например, оптимальных значений pH и/или концентрации соли.

[0303] В одном варианте осуществления DDpp специфически связывает представляющую интерес мишень (например, BCMA, CD123, AFP или p26 AFP) с K_{Off} в диапазоне от 0,1 до 10^{-7} сек⁻¹, от 10^{-2} до 10^{-7} сек⁻¹ или от $0,5 \times 10^{-2}$ до 10^{-7} сек⁻¹. В конкретном варианте осуществления DDpp (например, слитый белок DDpp) связывает представляющую интерес мишень со скоростью диссоциации (K_{Off}) менее чем 5×10^{-2} сек⁻¹, 10^{-2} сек⁻¹, 5×10^{-3} сек⁻¹ или 10^{-3} сек⁻¹. В дополнительном варианте осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень со скоростью диссоциации (K_{Off}) менее, чем 5×10^{-4} сек⁻¹, 10^{-4} сек⁻¹, 5×10^{-5} сек⁻¹ или 10^{-5} сек⁻¹, 5×10^{-6} сек⁻¹, 10^{-6} сек⁻¹, 5×10^{-7} сек⁻¹ или 10^{-7} сек⁻¹.

[0304] В одном варианте осуществления DDpp специфически связывает представляющую интерес мишень (например, BCMA, CD123, AFP или p26 AFP) с K_{On} в диапазоне от 10^3 до 10^7 M⁻¹сек⁻¹, от 10^3 до 10^6 M⁻¹сек⁻¹, или от 10^3 до 10^5 M⁻¹сек⁻¹. В конкретном варианте осуществления DDpp (например, слитый белок DDpp) связывает представляющую интерес мишень со скоростью ассоциации (K_{On}) более чем 10^3 M⁻¹сек⁻¹, 5×10^3 M⁻¹сек⁻¹, 10^4 M⁻¹сек⁻¹ или 5×10^4 M⁻¹сек⁻¹. В дополнительном варианте осуществления DDpp связывает представляющую интерес мишень с K_{On} более, чем 10^5 M⁻¹сек⁻¹, 5×10^5 M⁻¹сек⁻¹, 10^6 M⁻¹сек⁻¹ или 5×10^6 M⁻¹сек⁻¹ или 10^7 M⁻¹сек⁻¹.

[0305] Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие раскрытый DDpp, включены в данный документ, как и векторы, содержащие эти нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева, содержащие эти векторы нуклеиновых кислот, и способы получения слитых белков DDpp-альбумин и применение этих нуклеиновых кислот, векторов и/или клеток-хозяев. Изобретение также охватывает фармацевтические составы, содержащие слитый белок DDpp-альбумин и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Такие составы могут быть использованы в способах лечения, профилактики, улучшения или диагностики заболевания или симптома заболевания у пациента, предпочтительно млекопитающего, наиболее предпочтительно человека, включающих этап введения фармацевтического состава пациенту.

Получение DDpp

[0306] Раскрытый DDpp может быть обычно получен с использованием коммерчески доступных реагентов и методик, известных в данной области техники. В одном варианте осуществления DDpp синтезируют способами твердофазного синтеза, известными в данной области техники, такими как, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 (1963); Davis et al., Biochem. Intl. 10: 394-414 (1985); Larsen et al., J. Am. Chem. Soc. 115:

6247 (1993); Smith et al., *J. Peptide Protein Res.* 44: 183 (1994); O'Donnell et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118: 6070 (1996); Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freeman (1969); Finn et al., *The Proteins*, 3.sup.rd ed., 2: 105-253 (1976) и Erickson et al., *The Proteins*, 3.sup.rd ed., 2: 257-527 (1976). В данном изобретении рассматриваются синтетические пептиды. В качестве альтернативы, пептид экспрессируется рекомбинантно путем введения нуклеиновой кислоты, кодирующей раскрытый DDpp, в клетки-хозяева, которые культивируют для экспрессии пептида. Такие пептиды очищают от культуральной среды или клеточного дебриса.

[0307] Получение DDpp, пригодного для практического применения предложенных способов, может быть осуществлено с использованием различных стандартных методов химического синтеза, полусинтетических методов и методик рекомбинантных ДНК, известных в данной области техники. Также предложен способ получения DDpp, индивидуально или как часть многодоменного слитого белка, в качестве растворимых агентов и белков, ассоциированных с клетками.

[0308] Необязательно, эталонная последовательность и/или модифицированные полипептиды (например, DDpp) могут быть де-иммунизированы. Например, остатки или мотивы, которые являются потенциально иммуногенными, могут быть идентифицированы и модифицированы для уменьшения или элиминирования потенциальных иммунных ответов на DDpp. Дополнительные подробности, относящиеся к различным вариантам изготовления, выбора и выделения DDpp, представлены более подробно ниже.

Рекомбинантная экспрессия DDpp

[0309] В некоторых вариантах осуществления DDpp, такой как слитый белок DDpp, «рекомбинантно продуцируется», (т.е., продуцируется с использованием технологии рекомбинантных ДНК). Иллюстративные рекомбинантные способы, доступные для синтеза слитых белков DDpp, включают, без ограничения, синтез на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), конкатемеризацию, бесшовное клонирование и лигирование в обратном направлении. (RDL) (см., например, Meyer et al., *Biomacromolecules* 3: 357-367 (2002); Kurihara et al., *Biotechnol. Lett.* 27: 665-670 (2005); Haider et al., *Mol. Pharm.* 2: 139-150 (2005) и McMillan et al., 32: 3643-3646 (1999), содержание каждого из которых включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

[0310] Также предложены нуклеиновые кислоты, содержащие полинуклеотидную последовательность, кодирующую DDpp. Такие полинуклеотиды необязательно дополнительно содержат один или более элементов контроля экспрессии. Например,

полинуклеотид может содержать один или более промоторов или энхансеров транскрипции, сайты связывания рибосом, сигналы терминации транскрипции и сигналы полиаденилирования в качестве элементов контроля экспрессии. Полинуклеотид может быть вставлен в любой подходящий вектор, который может содержаться в любой подходящей клетке-хозяине для экспрессии.

[0311] Экспрессия нуклеиновых кислот, кодирующих DDpp, обычно достигается путем функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей DDpp, с промотором в векторе экспрессии. Типичные векторы экспрессии содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, пригодные для регуляции экспрессии желаемой последовательности нуклеиновой кислоты. Способы, известные в данной области техники, могут быть использованы для обычного конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую DDpp, вместе с соответствующими сигналами контроля транскрипции/трансляции. Эти методы включают, без ограничения, методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и рекомбинацию *in vivo*/генетическую рекомбинацию. Экспрессия полинуклеотида может быть осуществлена в любом подходящем хозяине экспрессии, известном в данной области техники, включая, без ограничения, бактериальные клетки, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки растений или клетки млекопитающих. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая DDpp, функционально связана с подходящей последовательностью промотора, так что последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируется и/или транслируется в DDpp у хозяина. Промоторы, пригодные для экспрессии в *E.coli*, включают, без ограничения, промотор T7.

[0312] В одном варианте осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую DDpp, вводят в клетку-хозяина (например, фагмиду) для экспрессии DDpp. Вектор может оставаться эписомальным или становиться хромосомно интегрированным до тех пор, пока вставка, кодирующая терапевтический агент, может быть транскрибирована. Векторы могут быть сконструированы с помощью стандартной технологии рекомбинантных ДНК. Векторами могут быть плазмиды, фаги, космиды, фагмиды, вирусы или любые другие типы, известные в данной области техники, которые используются для репликации и экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках. Специалисту в данной области техники будет понятно, что в такие векторы может быть включено широкое разнообразие компонентов, известных в данной области техники (таких как элементы управления экспрессией), включая широкий спектр сигналов транскрипции, таких как промоторы и другие последовательности, которые регулируют

связывание РНК-полимеразы с промотором. Любой промотор, известный или продемонстрированный как эффективный в клетках, в которых будет экспрессироваться вектор, может быть использован для инициации экспрессии DDpp. Подходящие промоторы могут быть индуцибельными (например, регулируемые) или конститутивными. Неограничивающие примеры подходящих промоторов включают область раннего промотора SV40, промотор, содержащийся в 3'-длинном концевом повторе вируса саркомы Рауса, промотор тимидинкиназы HSV-1 (вирус простого герпеса-1), регуляторные последовательности гена металлотионеина и т.д., а также следующие области контроля транскрипции животных, которые проявляют тканевую специфичность и были использованы у трансгенных животных: область контроля гена эластазы I, которая активна в ацинарных клетках поджелудочной железы; область контроля гена инсулина, которая активна в бета-клетках поджелудочной железы, область контроля вируса опухоли молочной железы мыши, которая активна в клетках яичка, молочной железы, лимфоидных клеток и тучных клеток, область контроля гена альбумина, которая активна в печени, область контроля гена альфа-фетопротейна, которая активна в печени, область контроля гена альфа-1-антитрипсина, которая активна в печени, область контроля гена бета-глобина, которая активна в эритроидных клетках, область контроля гена основного белка миелина, которая активна в клетках олигодендроцитов в мозге, область контроля гена легких цепей миозина 2, которая активна в скелетных мышцах, и область контроля генов гонадотропин-высвобождающего-гормона, которая активна в гипоталамусе. В конкретном варианте осуществления промотор представляет собой область контроля гена иммуноглобулина, которая активна в лимфоидных клетках.

[0313] В одном варианте осуществления одна или более нуклеиновых кислот, кодирующих DDpp, экспрессируются под контролем конститутивного промотора или, альтернативно, регулируемой системы экспрессии. Подходящие системы регулируемой экспрессии включают, без ограничения, систему экспрессии, регулируемую тетрациклином, систему экспрессии, индуцируемую экдизоном, систему экспрессии с лактозным переключателем, систему экспрессии, индуцируемую глюкокортикоидами, систему индуцируемых температурой промоторов и металлотионеиновую металл-индуцируемую систему экспрессии. Если в системе клеток-хозяев содержится несколько различных нуклеиновых кислот, кодирующих DDpp, некоторые из нуклеиновых кислот могут экспрессироваться под контролем конститутивного промотора, тогда как другие могут экспрессироваться под контролем регулируемого промотора. Уровни экспрессии могут быть определены способами, известными в данной области техники, включая вестерн-блот анализ и нозерн-блот анализ.

[0314] Для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей DDpp, можно использовать множество векторных систем экспрессии хозяина. Векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие DDpp (например, самостоятельные субъединицы DD или слитые DDpp) или их части или фрагменты, включают плазмидные векторы, одноцепочечные и двухцепочечные фаговые векторы, а также одноцепочечные и двухцепочечные вирусные векторы РНК или ДНК. Фаговые и вирусные векторы также могут быть введены в клетки-хозяева в форме упакованного или инкапсулированного вируса с использованием известных методов заражения и трансдукции. Кроме того, вирусные векторы могут быть компетентными в отношении репликации или, альтернативно, дефектными в отношении репликации. Альтернативно, бесклеточные трансляционные системы также могут быть использованы для получения белка с использованием РНК, полученных из экспрессирующих конструкций ДНК (см., например, WO86/05807 и WO89/01036, и патент США № 5122464, каждая из которых включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

[0315] Как правило, любой тип клеток или культивируемой клеточной линии может быть использован для экспрессии DDpp, предложенного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фоновая клеточная линия, используемая для создания сконструированных клеток-хозяев, представляет собой фаг, бактериальную клетку, дрожжевую клетку или клетку млекопитающего. Для экспрессии кодирующей последовательности слитого белка DDpp может использоваться множество векторных систем экспрессии хозяина. Клетки млекопитающих можно использовать в качестве систем клеток-хозяев, трансфицированных рекомбинантными плазмидными ДНК или векторами экспрессии космидной ДНК, содержащими кодирующую последовательность представляющей интерес мишени и кодирующей последовательности слитого полипептида.

[0316] Клетки могут быть первичными изолятами организмов (включая человека), культурами или клеточными линиями трансформированной или трансгенной природы. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой Т-клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин получена от пациента-человека.

[0317] Пригодные клетки-хозяева включают, без ограничения, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантной ДНК бактериофага, векторы экспрессии плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащие последовательности, кодирующие DDpp; дрожжи (например, *Saccharomyces*,

Pichia), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими последовательности, кодирующие DDpp; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными векторами экспрессии вирусов (например, *Vaculovirus*), содержащие кодирующие последовательности DDpp; системы растительных клеток, инфицированные рекомбинантными векторами экспрессии вирусов (например, вирус мозаики цветной капусты, *CaMV*; вирус табачной мозаики, *TMV*) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, *Ti*-плазида), содержащими кодирующие последовательности DDpp. В конкретных вариантах осуществления системы клеток млекопитающих используются для получения DDpp. В клеточных системах млекопитающих обычно используются рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, металлотioneиновый промотор) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор вируса коровьей оспы 7,5К).

[0318] Прокариоты, пригодные в качестве клеток-хозяев при получении DDpp, такого как слитый белок DDpp, включают грамотрицательные или грамположительные организмы, такие как, *E. coli* и *B. subtilis*. Векторы экспрессии для использования в прокариотических клетках-хозяевах обычно содержат один или более фенотипически селективируемых маркерных генов (например, гены, кодирующие белки, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам или обеспечивающие автотрофную потребность). Примеры пригодных прокариотических экспрессирующих векторов-хозяев включают серии векторов pKK223-3 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), pGEM1 (Promega, Wis., USA), pET (Novagen, Wis., USA) и pRSET (Invitrogen, Calif., USA) (см., например, Studier, *J. Mol. Biol.* 219: 37 (1991) и Schoepfer, *Gene* 124: 83 (1993)). Типичные последовательности промотора, часто используемые в векторах экспрессии прокариотических клеток-хозяев, включают T7, (Rosenberg et al., *Gene* 56: 125-135 (1987)), промотор бета-лактамазы (пенициллиназы), промоторную систему лактозы (Chang et al., *Nature* 275: 615 (1978)) и Goeddel et al., *Nature* 281: 544 (1979)), триптофановую (*trp*) промоторную систему (Goeddel et al., *Nucl. Acids Res.* 8: 4057 (1980)) и промотор *tac* (Sambrook et al., 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

[0319] В одном варианте осуществления используют системы эукариотических клеток-хозяев, включая дрожжевые клетки, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими кодирующую последовательность DDpp, такими как системы экспрессии, описанные в заявке США. № 60/344169 и WO03/056914 (способы получения человекоподобного гликопротеина в эукариотической

клетке-хозяине, отличной от клетки человека) (содержание каждого из которых включено в качестве ссылки в полном объеме). Иллюстративные дрожжи, которые можно использовать для получения предложенных композиций, таких как DD, включают дрожжи из родов *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomycetes* и *Kluyveromyces*. Дрожжевые векторы обычно содержат точку начала репликации последовательности из 2 μ дрожжевой плазмиды, автономно реплицирующуюся последовательность (ARS), область промотора, последовательности для полиаденилирования, последовательности для терминации транскрипции и селективируемый маркерный ген. Примеры последовательностей промотоов в дрожжевых экспрессирующих конструкциях включают промоторы из металлотионеина, 3-фосфоглицераткиназы (Hitzeman, J. Biol. Chem. 255: 2073 (1980)) и других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфат-изомераза, 3-фосфоглицерат мутаза, пируваткиназа, триозофосфазо-фосфоизомераза, фосфоизофосфоизомераза. Дополнительные подходящие векторы и промоторы для использования в экспрессии дрожжей, а также протоколы трансформации дрожжей известны в данной области техники. См., например, Fleeer, Gene 107: 285-195 (1991) и Hinnen, PNAS 75: 1929 (1978).

[0320] Системы культивирования на основе клеток насекомых и растений также пригодны для получения композиций по изобретению. Такие системы клеток-хозяев включают, например, системы клеток насекомых, инфицированные векторами экспрессии рекомбинантных вирусов (например, бакуловируса), содержащие кодирующую последовательность DD; системы растительных клеток, инфицированные векторами экспрессии рекомбинантного вируса (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированные векторами экспрессии рекомбинантной плазмиды (например, Ti-плазмидой), содержащей кодирующую последовательность DD, включая, без ограничения, системы экспрессии, раскрытые в пат. США № 6815184, публ. заявки США № 60/365769 и 60/368047, и WO04/057002, WO04/024927, и WO03/078614, содержание каждого из которых включено в данный документе в качестве ссылки в полном объеме.

[0321] В дополнительном варианте осуществления могут использоваться системы клеток-хозяев, включая системы клеток животных, инфицированные векторами экспрессии рекомбинантных вирусов (например, аденовирусы, ретровирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, лентивирусы), включая клеточные линии, сконструированные так, чтобы они содержали несколько копий ДНК, кодирующей DDpp, либо стабильно амплифицируемой (CHO/dhfr), либо нестабильно амплифицируемой в

двухминутных хромосомах (например, мышинные клеточные линии). В одном варианте осуществления вектор, содержащий полинуклеотид(ы), кодирующий DDpp, является полицистронным. Иллюстративные клетки млекопитающих, пригодные для получения этих композиций, включают клетки 293 (например, 293T и 293F), клетки CHO, клетки ВНК, клетки NS0, клетки SP2/0, клетки миеломы YO, клетки миеломы мыши P3X63, клетки PER, клетки PER.C6 (Stucell, Нидерланды) VERY, клетки Hela, клетки COS, клетки MDCK, клетки 3T3, клетки W138, клетки BT483, клетки Hs578T, клетки HTB2, клетки BT20, клетки T47D, клетки CRL7030, клетки HsS78Bst, клетки гибридомы и другие клетки млекопитающих. Дополнительные иллюстративные клетки-хозяева млекопитающих, которые применимы при практическом применении предложенных вариантов осуществления, включают, без ограничения, T-клетки. Некоторые примеры систем экспрессии и методов выбора описаны в следующих ссылках и ссылках, приведенных в них: Borth et al., *Biotechnol. Bioen.* 71(4): 266-73 (2000) в Werner et al., *Arzneimittel-forschung/Drug Res.* 48(8): 870-80 (1998), Andersen et al., *Curr. Op. Biotechnol.* 13: 117-123 (2002), Chadd et al., *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 188-194 (2001) и Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001). Дополнительные примеры систем экспрессии и методов отбора описаны в Logan et al., *PNAS* 81: 355-359 (1984), Birtner et al., *Methods Enzymol.* 153: 51-544 (1987)). Последовательности контроля транскрипции и трансляции для векторов экспрессии клеток-хозяев млекопитающих часто происходят из вирусных геномов. Обычно используемые промоторные последовательности и энхансерные последовательности в векторах экспрессии млекопитающих включают последовательности, полученные из вируса полиомы, аденовируса 2, вируса симана 40 (SV40) и цитомегаловируса человека (CMV). Иллюстративные коммерчески доступные векторы экспрессии для использования в клетках-хозяевах млекопитающих включают pCER4 (Invitrogen) и pcDNA3 (Invitrogen).

[0322] Физические способы введения нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина (например, клетку-хозяина млекопитающего) включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и тому подобное. Способы получения клеток содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

[0323] К биологическим способам введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяин относится использование векторов ДНК и РНК. Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко

используемым способом внедрения генов в клетки млекопитающих (например, клетки человека). Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивируса, поксвируса, вируса простого герпеса I типа, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. п. См., например, патенты США № 5350674 и 5585362, содержание каждого из которых включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

[0324] Способы введения представляющих интерес полинуклеотидов ДНК и РНК в клетку-хозяина включают электропорацию клеток, при которой к клеткам применяют электрическое поле, чтобы увеличить проницаемость клеточной мембраны, позволяя химическим веществам, лекарственным средствам или полинуклеотидам вводиться в клетку. Конструкции ДНК или РНК, содержащие DDpp, могут быть введены в клетки млекопитающих или прокариотические клетки с помощью электропорации.

[0325] В предпочтительном варианте электропорация клеток приводит к экспрессии DDpp-CAR на поверхности Т-клеток, НК-клеток, НКТ-клеток. Такая экспрессия может быть временной или стабильной в течение жизни клетки. Электропорацию можно проводить способами, известными в данной области техники, включая системы трансфекции MaxCyte GT® и STX® (MaxCyte, Гейтерсберг, штат Мэриленд, США).

[0326] К химическим способам введения полинуклеотида в клетку-хозяина относятся системы коллоидной дисперсии, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы, и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Примером коллоидной системы, используемой в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo*, является липосома (например, искусственная мембранная везикула). В случае использования невирусной системы доставки примером средства доставки является липосома. Предусмотрено использование липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте нуклеиновая кислота может быть связана с липидом. Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, может быть инкапсулирована в водном внутреннем пространстве липосомы, рассеяна по липидному бислою липосомы, присоединена к липосоме посредством линкерной молекулы, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, заключена в липосоме, связана в комплекс с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, объединена с липидом, может содержаться в виде суспензии в липиде, содержатся или быть связана в комплекс с мицеллой или любым другим образом связана с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/вектором экспрессии, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут

присутствовать в бислойной структуре, такой как мицеллы, или иметь «разрушенную» структуру. Также они могут быть просто рассеяны в растворе, предположительно образуя агрегаты, не имеющие одинаковых размера или формы. Липиды представляют собой жиры, которые могут быть природными или синтетическими липидами. Например, липиды включают в себя жировые капли, которые встречаются естественным образом в цитоплазме, и также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминспирты и альдегиды.

[0327] Подходящие для использования липиды можно получить из коммерческих источников. Например, димиристоилфосфатидилхолин («DMPC») можно получить от компании Sigma, Сент-Луис, штат Миссури; дицетилфосфат («DCP») можно получить от компании K & K Laboratories (Плейнвью, штат Нью-Йорк); холестерин («Choi») можно получить от компании Calbiochem-Behring; димиристоилфосфатидилглицерин («DMPG») и другие липиды можно получить от компании Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, штат Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить приблизительно при температуре -20°C . Хлороформ может быть использован в качестве единственного растворителя, поскольку он легче испаряется, чем метанол. «Липосома» представляет собой общий термин, охватывающий различные однослойные и многослойные липидные носители, получаемые посредством образования заключенных липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать, как содержащие везикулярные структуры с фосфолипидной бислойной мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы содержат много липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоперестройке до образования замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., *Glycobiology* 5: 505–510 (1991)). Однако также охватываются композиции, которые имеют структуры в растворе, отличные от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут принимать мицеллярную структуру или существовать только в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также предусмотрены комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

[0328] Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина, или наличия рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине обычно можно подтвердить с помощью различных анализов, известных в данной области техники. Такие анализы включают в себя, например, «молекулярно-биологические» анализы, хорошо известные в данной области

техники, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как выявление наличия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими способами (ИФА и вестерн-блоттинги) или путем анализов, описываемых в настоящем документе, для идентификации веществ, входящих в объем предложенных вариантов осуществления.

[0329] Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В целом, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется в реципиентном организме, ткани или клетке, и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется каким-либо легко определяемым свойством, например, ферментной активностью. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в реципиентные клетки. Неограничивающий перечень подходящих репортерных генов может включать гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, секретрируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., FEBS Lett. 479: 79–82 (2000)). Подходящие системы экспрессии известны в данной области техники и могут быть получены, используя известные методики, или приобретены на коммерческой основе. В целом, конструкция с минимальным 5' фланкирующим участком, демонстрирующая самый высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор. Такие промоторные участки могут обычно быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки способности веществ модулировать активированную промотором транскрипцию.

[0330] Ряд систем селекции можно использовать в системах экспрессии вектора-хозяина млекопитающего, включая, без ограничения, тимидинкиназу вируса простого герпеса, генов гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., Cell 22: 817 (1980)), которые могут быть использованы в клетках tk⁻, hgprt⁻ или aprt⁻, соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам может быть использована в качестве основы для отбора систем например, dhfr, gpt, neo, hyg^r, trpB, hisD, ODC (орнитин декарбоксилаза) и глутамин-синтаза.

Экспрессия ассоциированного с клетками DDpp

[0331] В другом варианте продуцирование DDpp приводит к композициям ассоциированного с клетками DDpp. Например, экспрессия рекомбинантных векторов, которые кодируют DDpp, функционально связанный с якорным или трансмембранным доменом клеточной мембраны, потенциально может оставаться ассоциированной с

клеткой. Химерные антигенные рецепторы, содержащие DDpp, намеренно связаны с клеткой и используются в контексте клетки, в которой они экспрессируются. Один конкретный вариант осуществления относится к стратегии переноса адоптивных клеток Т-клеток, которые были трансдуцированы для экспрессии DDpp химерного антигенного рецептора (CAR). Предпочтительно, клетка может быть генетически модифицирована, чтобы стабильно экспрессировать DDpp на своей поверхности, придавая новую специфичность к мишени, которая не зависит от ГКГС.

[0332] Множество векторов, полученных из вируса, можно использовать в тех случаях, когда вирусы используются для трансфекции и интеграции в геном клетки млекопитающего. Вирусы, используемые в качестве векторов, включают, но не ограничиваются этим, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Лентивирусные векторы особенно подходят для достижения долгосрочного переноса гена (например, адоптивной Т-клеточной иммунной терапии), поскольку они обеспечивают долговременную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом перед векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мышей, в том отношении, что они могут трансдуцировать неразмножающиеся клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности. В основном, подходящий вектор содержит сайт начала репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие участки узнавания рестрикционных эндонуклеаз и один или более селективируемых маркеров (например, WO 01/96584 и WO 01/29058, и патент США № 6326193). Несколько векторных промоторных последовательностей доступны для экспрессии трансгенов. Одним примером подходящего промотора является последовательность немедленно раннего промотора цитомегаловируса (ЦМВ). Эта последовательность промотора является последовательностью сильного конститутивного промотора, способной стимулировать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально с ней связанной. Другим примером подходящего промотора является EF1a. Однако могут также использоваться и другие последовательности конститутивного промотора, включая, помимо прочего, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинных концевых повторов (ДКП) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно ранний промотор вируса Эпштейна — Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы человеческого гена, такие как, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина,

промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Индуцируемые промоторы включают, без ограничения, металлотионеиновый промотор, глюкокортикоидный промотор, прогестероновый промотор и тетрациклиновый промотор.

[0333] Чтобы оценить экспрессию полипептида DDpp-CAR или его частей, вектор экспрессии, вводимый в клетку, может также содержать выбираемый маркерный ген, репортерный ген или и тот, и другой, чтобы способствовать идентификации и выбору экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые необходимо подвергнуть трансфекции или инфицировать вирусными векторами, в других аспектах селективируемый маркер может быть нанесен на отдельный фрагмент ДНК и использован в процедуре котрансфекции. Как селективные маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями, чтобы обеспечить экспрессию в клетке-хозяине. К пригодным для использования селективным маркерам относятся, например, устойчивые к антибиотикам гены, такие как нео и т. п.

[0334] До размножения и генетической модификации Т-клеток источник Т-клеток получают от субъекта. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая моноклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань вилочковой железы, ткань области инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В различных вариантах осуществления может использоваться любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области техники.

[0335] Полное обсуждение способов выделения, культивирования, активации и размножения Т-клеток можно найти в WO/12079000, содержание которой полностью включено в данное описание посредством ссылки.

[0336] Дополнительно предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновые кислоты, кодирующие DDpp, описанные в данном документе. Также предложены композиции, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую DDpp.

[0337] Используемый в данном документе термин «коэкспрессируется» относится к одновременной экспрессии двух или более кодирующих белок последовательностей. Кодирующими последовательностями могут быть нуклеиновые кислоты, кодирующие, например, один белок или химерный белок в виде одной полипептидной цепи.

Химический синтез DDpp

[0338] В дополнение к рекомбинантным способам, изготовление DDpp также может быть осуществлено с использованием органического химического синтеза желаемого полипептида с использованием различных жидких и твердофазных

химических процессов, известных в данной области техники. Различные автоматические синтезаторы являются коммерчески доступными и могут использоваться в соответствии с известными протоколами. См., например, Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.* 105: 6442 (1983); Merrifield, *Science* 232: 341-347 (1986); Barany and Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1- 284; Barany et al., *Int. J. Pep. Protein Res.* 30: 705-739 (1987); Kelley et al. in *Genetic Engineering Principles and Methods*, Setlow, J. K., ed. Plenum Press, NY. 1990, vol. 12, pp. 1-19; Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, 1989. Одним из преимуществ данных методологий является то, что они допускают включение не встречающихся в природе аминокислотных остатков в последовательность DDpp.

[0339] DDpp, которые используются в описанных в данном документе способах, могут быть модифицированы во время или после синтеза или трансляции, например, путем гликозилирования, ацетилирования, бензилирования, фосфорилирования, амидирования, пегилирования, формилирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связи с молекулой антитела, гидроксирования, йодирования, метилирования, миристоилирования, окисления, пегилирования, протеолитической обработки, фосфорилирования, пренилирования, рацемизации, селеноилирования, сульфатирования, убиквитинирования и т.д. (см., например, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2d Ed. (W.H. Freeman and Co., N.Y., 1992); *Postranslational Covalent Modification of Proteins*, Johnson, ed. (Academic Press, New York, 1983), pp. 1-12; Seifter, *Meth. Enzymol.* 182: 626-646 (1990); Rattan, *Ann. NY Acad. Sci.* 663: 48-62 (1992).) В конкретных вариантах осуществления пептиды являются ацетилированными на N-конце и/или амидированными на C-конце.

[0340] В данном изобретении также предложены производные DDpp и включают полипептиды, которые были химически модифицированы каким-либо образом, отличным от добавления, делеции или замены аминокислот. В этом отношении DDpp химически связан с полимерами, липидами, другими органическими фрагментами и/или неорганическими фрагментами. Иллюстративные модификации полипептидов приведены в Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, (1996). DDpp необязательно содержит функциональную группу, которая облегчает конъюгирование с другим фрагментом (например, пептидным фрагментом). Иллюстративные функциональные группы включают, без ограничения, производные изотиоцианата, изоцианата, ацилазида, сложного эфира NHS, сульфонилхлорида, альдегида, эпоксида, оксирана, карбоната, арилирующий агент, имидоэфира, карбодиимида, ангидрида, производные

алкилгалогенидов (например, производные галоацетила), малеимид, азиридин, акрилоильные производные, арилирующие агенты, тиолдисульфидные обменные реагенты (например, пиридилдисульфиды или тиол TNB), диазоалкан, карбоксилдимадазол, N, N'-дисукцинилкарбонат, N-гидроксисукцинимидилхлорформат и гидразы. Малеимид полезен, например, для создания DDpp, который связывает альбумин *in vivo*.

[0341] В некоторых вариантах осуществления DDpp ковалентно модифицируется для включения одного или более водорастворимых полимерных соединений. Водорастворимый полимер (или другой химический фрагмент) присоединен к любому аминокислотному остатку, хотя присоединение к N- или C-концу является предпочтительным в некоторых вариантах осуществления. Пригодные полимеры включают, без ограничения, ПЭГ (например, ПЭГ размером приблизительно 40 кДа, 30 кДа, 20 кДа, размером 10 кДа, 5 кДа или 1 кДа), полиоксиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, монометокси-полиэтиленгликоль, декстран гидроксиэтилкрахмал, целлюлоза, поли- (N-винилпирролидон) -полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропиленоксида/этиленоксида, полисиаловая кислота (PSA), полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин) и поливиниловый спирт, как а также смеси любого из вышеперечисленного. В одном варианте осуществления DDpp является пэгилированным. Фрагменты PEG доступны в различных формах, например, линейные или разветвленные. Для дальнейшего обсуждения растворимых в воде полимерных присадок см. патент США № 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337. Другие фрагменты, пригодные для улучшения периода полужизни или стабильности пептида, описаны в данном документе и включают, например, альбумин (необязательно модифицированный для обеспечения конъюгации с DDpp), цепи жирных кислот (например, жирные кислоты C12-C18, такие как жирные кислоты C14) или дикарбоновые кислоты, такие как октадекан дикарбоновая кислота (oddc), антитело или его фрагмент (например, Fc-часть антитела) и пролин-аланин-сериновые мультимеры.

[0342] В некоторых вариантах осуществления DDpp конъюгирован с фрагментом полиэтиленгликоля (ПЭГ), сывороточным альбумином человека (ЧСА), антителом или фрагментом антитела, гидроксиэтилкрахмалом, мультимером пролин-аланин-серин (PASylation), жирной кислотой C12-C18 или полисиаловой кислотой.

[0343] В некоторых вариантах осуществления DDpp ацилируют по N-концевой аминокислоте пептида. В другом аспекте DDpp амидируются по C-концевой аминокислоте полипептида. В еще одном дополнительном аспекте пептиды ацилированы по N-концевой аминокислоте пептида и амидированы по C-концевой аминокислоте

пептида.

[0344] В некоторых вариантах осуществления DDpp содержит одну или более модифицированных или непротеиногенных аминокислот или модифицированную линкерную группу (см., например, Grant, *Synthetic Peptides: A User's Guide*, Oxford University Press (1992)). Модифицированные аминокислоты включают, например, аминокислоты, в которых амино и/или карбоксильная группа заменена другой группой. Неограничивающие примеры включают модифицированные аминокислоты, включающие тиамиды, мочевины, тиомочевины, ацилгидразиды, сложные эфиры, олефины, сульфонамиды, амиды фосфорной кислоты, кетоны, спирты, амиды бороновой кислоты, бензодиазепины и другие ароматические или неароматические гетероциклы (см., Estiarte et al., *Burgers Medicinal Chemistry*, 6.sup.th edition, Volume 1, Part 4, John Wiley & Sons, New York (2002)). Непротеиногенные аминокислоты включают, без ограничения, бета-аланин (Bal), норвалин (Nva), норлейцин (Nle), 4-аминомасляную кислоту (гамма-Abu), 2-аминоизомасляную кислоту (Aib), 6-аминогексановую кислоту (эпсилон-Ahx), орнитин (Orn), гидроксипролин (Hyp), таурин, саркозин, цитруллин (Cit), цистеиновую кислоту (Coh), циклогексилаланин (Cha), метионинсульфоксид (Meo), метионинсульфон (Moo), гомосерин-метиловый эфир (Hsm), пропаргилглицин (Eag), 5-фтортриптофан (5Fw), 6-фтортриптофан (6Fw), 3',4'-диметоксифенил-аланин (Eag), 3',4'-дифторфенилаланин (Dff), 4'-фторфенил-аланин (Pff), 1-нафтил-аланин (1Ni), 2-нафтилаланин (2Ni), 1-метилтриптофан (1Mw), пеницилламин (Pen), гомосерин (Hse), t-бутилглицин, t-бутилаланин, фенилглицин (Phg), бензотиенилаланин (Bta), L-гомо-цистеин (Hcy), N-метил-фенилаланин (Nmf), 2-тиенилаланин (Thi), 3,3-дифенилаланин (Ebw), L-альфа-t-бутилглицин (Tle), Бра, гомофенилаланин (Hfe) и S-бензил-L-цистеин (Ece). Эти и другие непротеиногенные аминокислоты могут существовать в виде D- или L-изомеров. Примеры модифицированных линкеров включают, без ограничения, гибкий линкер 4,7,10-триокса-1,13-тридеканедиамин (Ttds), глицин, 6-аминогексановая кислота, бета-аланин (Bal), пентиновая кислота (Pyn) и комбинации Ttds, глицина, 6-аминогексановой кислоты и Bal.

[0345] Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена известными способами, включая, без ограничения, ацетилирование, формилирование и т.д. Кроме того, производное может содержать одну или более неклассических аминокислот.

Таблица 1 - Иллюстративные мишень-специфические связывающие DD

SEQ ID NO:	Последовательность домена D	Мишень	ИФА_сред

11	MGSWYEFWRLQAIHQRLNALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRAYAAGIRG ALQAYRHN	BCMA	9,48683
12	MGSWHEFTWRLIAIQQRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRAYAAGIRH HLQAYRHN	BCMA	17,125
13	MGSWREFAWRLVAINSRKALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRHYAASIRD GLQAYRHN	BCMA	9,66
14	MGSWHEFAWRLQAINQRLNALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRHYAAHIRN GLQAYRHN	BCMA	13,14
15	MGSWNEFAWRLTAIEQRLMALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRHYAAGIRD NLQAYRHN	BCMA	18,28
16	MGSWTEFAWRLQAIHQRLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRVYAAKIRI SLQAYRHN	BCMA	18,71
17	MGSWIEFAWRLQAIHQRLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLREYAAANIRD SLQAYRHN	BCMA	18,97
18	MGSWHEFTWRLVAIQQRQLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRKFAAKIRY ELQAYRHN	BCMA	19,51
19	MGSWHEFTWRLIAIRERLFALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELREYAAASIRNM LQAYRHN	BCMA	12,99
20	MGSWIEFSWRLEAIRQRLQALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRSYAARIRQE LQAYRHN	BCMA	9,92
21	MGSWVEFSWRLEAIRQRLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRSYAARIRQ ELQAYRHN	BCMA	19,14
22	MGSWVEFSWRLEAIRQRLTALGGSEAELAAFE	BCMA	21,3

	KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRKYAARIRG ELQAYRHN		
23	MGSWVEFAWRLTAIDQRLSALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLRFYAAKIRS HLQAYRHN	BCMA	8,43
24	MGSWVEFAWRLEAIKQRLTALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRLYAAKIRR VLQAYRHN	BCMA	8,9
25	MGSWVEFAWRLTAIHTRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRKYAAKIRK QLQAYRHN	BCMA	6,08
26	MGSWTEFAWRLEAINQRLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGPVEALRAYAAKIRT RLQAYRHN	BCMA	15,1475
27	MGSWSEFAWRLEAIHQRLSALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRLFAAQIRE NLQAYRHN	BCMA	18,04
28	MGSWNEFAWRLIAINQRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRHFAANIRN DLQAYRHN	BCMA	11,53
29	MGSWTEFAWRLIAIDQRLMALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEILRELA AEIRFH LQAYRHN	BCMA	8,55
30	MGSWSEFMNRLDAITYRLVALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVELLRHYAAQIRD SLQAYRHN	BCMA	12,9
31	MGSWTEFMERLDAISYRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRDYAAIIRN SLQAYRHN	BCMA	9,87
32	MGSWAEFMDRLDAITYRLWALGGSEAELA AF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRGYAAIIRS ELQAYRHN	BCMA	10,83
33	MGSWIEFQERLDAIFYRLHALGGSEAELA AF EK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRDAAATIRRQ	BCMA	18,58

	LQAYRHN		
34	MGSWIEFQQRDLDAIFYRLYALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKGNPEVENLRDMAAIRKQ LQAYRHN	BCMA	20,02
35	MGSWYEFQSRLDAIFYRLFALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKGNPEVEKLREAAASIRTQ LQAYRHN	BCMA	14,08
36	MGSWSEFIDRLDAITYRLFALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKGNPEVENLRWYAGVIRE QLQAYRHN	BCMA	10,18
37	MGSWSEFYDRLYAINQRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEDLRWYAAFIR AQLQAYRHN	BCMA	5,98
38	MGSWYEFYDRLDAIVHRLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVENLRWYAAMIR VRLQAYRHN	BCMA	14,68
39	MGSWVEFQDRLEAITDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRYSAAMIRV ILQAYRHN	BCMA	8,87825
40	MGSWVEFQERLMAISDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRWQAAMIR YTLQAYRHN	BCMA	6,7
41	MGSWVEFQHRLEAISMRLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRWQAAYIR VVLQAYRHN	BCMA	4,05
42	MGSWVEFQSRLEAIATRLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRWQAAWIR MMLQAYRHN	BCMA	18,0075
43	MGSWEEFQYRLGAIARLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRWQAAMIR FMLQAYRHN	BCMA	3,11
44	MGSWYEFQVRLQAISWRLKALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNHEVEELRIQAALIRV MLQAYRHN	BCMA	14,23

45	MGSWVEFRSRLEAISNRLRALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRTTAALIRVY LQAYRHN	BCMA	3,04
46	MGSWVEFKARLEAISSRLTALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRYSAALIRVY LQAYRHN	BCMA	8,70714
47	MGSWSEFYTRLEAINNRLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRYTAALIRIY LQAYRHN	BCMA	3,66
48	MGSWAEFYHRLDAISSRLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRYTAALIRIY LQAYRHN	BCMA	4,31
49	MGSWTEFASRLVAIRQRLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRYSAAIIRV MLQAYRHN	BCMA	7,99
50	MGSWSEFDQRLAAIYQRLNALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRYSAALIRV MLQAYRHN	BCMA	7,72
51	MGSWVEFHNRLSAISDRLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRYSAALIRV MLQAYRHN	BCMA	7,36
52	MGSWNEFEDRLSAISARLSALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRYSAALIRVM LQAYRHN	BCMA	4,09
53	MGSWVEFEYRLVAIFDRLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRYQAALIRV MLQAYRHN	BCMA	7,63
54	MGSWVEFQGRLGAIHERLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRYSAALIRV FLQAYRHN	BCMA	3,83429
55	MGSWYEFMRLSAIWERLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRYQAALIRF YLQAYRHN	BCMA	7,12
56	MGSWTEFSQRLGAISERLYALGGSEAELAAFEK	BCMA	4,15

	EIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRYSAALIRFM LQAYRHN		
57	MGSWTEFHDRLEAITHRLNALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRYSAALLRV FLQAYRHN	BCMA	5,79
58	MGSWTEFEHRLEAIAIGRLNALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRYSAALIRF WLQAYRHN	BCMA	6,34
59	MGSWTEFANRLEAINARLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRFSALIRV YLQAYRHN	BCMA	6,42
60	MGSWEEFDRRLYAIARRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRYQAALIRV WLQAYRHN	BCMA	8,85
61	MGSWIEFHQRLEAIVTRLEALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRYQAALIRVF LQAYRHN	BCMA	8
62	MGSWSEFYDRLKAIADRLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRTEAAIIRVY LQAYRHN	BCMA	8,215
63	MGSWWEFEDRLSAIMERLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRYRAAIIRV YLQAYRHN	BCMA	10,39
64	MGSWVEFEERLAAIATRLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRWRAAIIRV YLQAYRHN	BCMA	16,29
65	MGSWSEFRGRLQAIHSRLNALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRYSAAIIRIY LQAYRHN	BCMA	7,585
66	MGSWTEFRDRLGAIYHRLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRYQAIIIRV YLQAYRHN	BCMA	6,7
67	MGSWVEFYHRLEAIRYRLSALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRYVAAVIRY	BCMA	7,8

	RLQAYRHN		
68	MGSWVEFYDRLEAIRYRLSALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEELRYIAAVIRY RLQAYRHN	BCMA	5,636
69	MGSWVEFYDRLAAIRKRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEELRFRAALIRI WLQAYRHN	BCMA	9,76
70	MGSWEEFSEERLEAISIRLRALGGSEAELAAFEKE IAAFESELQAYKGGKNPEVEELRVSAAIIRVWL QAYRHN	BCMA	11,26
71	MGSWSEFSDRLHAISDRLQALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKNPEVEELRIQAAIIRVWL QAYRHN	BCMA	6,3725
72	MGSWIEFSHRLEAIVDRLGALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKNPEVEELRNTAAIIRVYL QAYRHN	BCMA	18,67
73	MGSWEEFSDRLEAILRRLDALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKNPEVEDLRFAAAIIRVQ LQAYRHN	BCMA	9,08
74	MGSWMEFSHRLDAIHERLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEDLRFAAAIIRV QLQAYRHN	BCMA	6,3
75	MGSWSEFQQLHAIRTRLIALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEELRFEAAIIRV MLQAYRHN	BCMA	11,615
76	MGSWYEFQNRLLGAINRRLNALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEELRFEAAIIRV MLQAYRHN	BCMA	4,68
77	MGSWQEFTGRLHAIRHRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEELRFEAAIIRV WLQAYRHN	BCMA	3,315
78	MGSWTEFDHRLGAIWERLVALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEELRFHAAIIRIF LQAYRHN	BCMA	9,54

79	MGSWTEFHVRLSAIWDRLVALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRFHAAIIRIV LQAYRHN	BCMA	23,62
80	MGSWNEFDNRLQAIWDRLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRFHAAMIRI TLQAYRHN	BCMA	9,87
81	MGSWTEFHERLQAIWFRLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRFRAAIIRLY LQAYRHN	BCMA	12,0656
82	MGSWNEFSGRLTAIKDRLAALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRFRAAVIRL WLQAYRHN	BCMA	3,39
83	MGSWVEFDERLVAIWFRRLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEALRARAAYIRI WLQAYRHN	BCMA	8,96
84	MGSWSEFGQRLSAIWERLLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEALRADAAFIRI WLQAYRHN	BCMA	14,01
85	MGSWYEFEDRLVAIWIRLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRYNAAFIRG ALQAYRHN	BCMA	4,93
86	MGSWYEFGDRLSAIWERLAALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRTHAAEIRTI LQAYRHN	BCMA	8,895
87	MGSWHEFYRLEAIEQRLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVETLRFDAALIRIY LQAYRHN	BCMA	3,73
88	MGSWSEFEERLAAIGSRLFALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVETLRFDAALIRIYL QAYRHN	BCMA	4,85
89	MGSWLEFHRYRLHAIQFRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVETLRHIAALIRN QLQAYRHN	BCMA	12,7486
90	MGSWQEFYNRLEAIHMRLFALGGSEAELAAFE	BCMA	6,47

	KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEGLRSDAAPIRD VLQAYRHN		
91	MGSWNEFHRLWAIFDRLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRKMAAGIR GGLQAYRHN	BCMA	3,88
92	MGSWYEFHYRLKAINDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRYSAAMIRH KLQAYRHN	BCMA	6,04
93	MGSWTEFHQRLGAIHARLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRFSAAFIRL KLQAYRHN	BCMA	8,87
94	MGSWFEFQYRLEAIFYRLLALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKPKPEVEELRVRAALIRHL LQAYRHN	BCMA	17,31
95	MGSWVEFHARLDAIYTRLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRLVLAHIRI SLQAYRHN	BCMA	3,8
96	MGSWVEFGTRLSAIYNRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRFEEAIIIRIM LQAYRHN	BCMA	15,425
97	MGSWVEFTHRLDAIYIRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRHEAAVIRE ELQAYRHN	BCMA	13,9167
98	MGSWVEFHGRLAAIYVRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRYHAAMIRR NLQAYRHN	BCMA	4
99	MGSWVEFDRRLVAIYIRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEALRDDAALIRL LLQAYRHN	BCMA	8,93
100	MGSWVEFDRRLVAIYIRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRIDAATIRE TLQAYRHN	BCMA	8
101	MGSWLEFDRRLTAIYLRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEALREDAAMIR	BCMA	9,82

	DMLQAYRHN		
102	MGSWIEFDRRLIAIHVRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEVLRADAAKIR MELQAYRHN	BCMA	13,72
103	MGSWIEFDRRLIAIWIRLWALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKGNPEVESLRSDAADIRQK LQAYRHN	BCMA	9,45
104	MGSWVEFDRRLIAIWVRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEFLRSDAAMIRE HLQAYRHN	BCMA	5,77
105	MGSWYEFHTRLIAIYVRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEWLRGDAAKIR GYLQAYRHN	BCMA	4,06
106	MGSWSEFSTRLSAIYVRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEYLRNKAASIRK TLQAYRHN	BCMA	5,35
107	MGSWVEFRYRLGAIYHRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEVLRDRAATIRR LLQAYRHN	BCMA	10,81
108	MGSWNEFRNRLGAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVETLRAHAAIIRS VLQAYRHN	BCMA	4,69667
109	MGSWHEFRNRLGAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVETLRARAAMIRS VLQAYRHN	BCMA	3,49359
110	MGSWTEFYQRLEAINFRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEVLRDKAALIRL MLQAYRHN	BCMA	6,955
111	MGSWNEFYNRLHAINLRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEVLRHAAIIRQ ALQAYRHN	BCMA	3,00395
112	MGSWEEFYGRLSAIQDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEWLRMHA AVIR RALQAYRHN	BCMA	3,28

113	MGSWGEFNLRLVAIHVRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRSQAANIRA QLQAYRHN	BCMA	12,81
114	MGSWGEFSDRLEAINERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRWQAAFIRA NLQAYRHN	BCMA	4,26
115	MGSWMEFQGRLPAILARLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEHLRDKAAYIR WMLQAYRHN	BCMA	8,32
116	MGSWMEFEGRLPAILARLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEHLRDKAAYIR WMLQAYRHN	BCMA	3,93
117	MGSWFEFQNRLQAILFRLRALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLRDKAAYIRL MLQAYRHN	BCMA	5,39333
118	MGSWVEFDMRLQAILERLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEHLRDSAAYIRL MLQAYRHN	BCMA	23,525
119	MGSWVEFNARLDAILFRLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEHLRDQAAYIRL MLQAYRHN	BCMA	13,52
120	MGSWMEFNVRLRAILDRLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVELLRDKAAYIRF MLQAYRHN	BCMA	15,59
121	MGSWIEFDTRLAAIVHRLRALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVELLRDKAAYIRY MLQAYRHN	BCMA	13,9475
122	MGSWIEFDYRLKAILHRLRALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEGLRDKAAYIRFL LQAYRHN	BCMA	11,8767
123	MGSWYEFEDRLLAIKVRRLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRDQAAYIRF MLQAYRHN	BCMA	17,6133
124	MGSWYEFQDRLSAITTRLRALGGSEAELAAFE	BCMA	10,085

	KEIAAFESELQAYKGKGNPEVELLRDKAAYIRF MLQAYRHN		
125	MGSWEEDDRLNAIVYRLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEMLRDQAAYIR LMLQAYRHN	BCMA	18,64
126	MGSWVEFEQRLHAIVVRLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGGNPEVENLRDQAAYIRF MLQAYRHN	BCMA	17,7467
127	MGSWVEFEWRLEAIVVRLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEHLRDKAAYIRY MLQAYRHN	BCMA	14,95
128	MGSWYEFHRLKAIVSRLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEHLRDKAAYIRY MLQAYRHN	BCMA	4,55
129	MGSWMEFKHRLAAITFRLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVELLRDKAAYIRL LLQAYRHN	BCMA	6,06
130	MGSWMEFEGRLHAIKRRLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEVLRDQAAYIRL LLQAYRHN	BCMA	7,335
131	MGSWSEFVFRDLTIKSRLRALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGKGNPEVETLRDQAAYIRLM LQAYRHN	BCMA	19,86
132	MGSWYEFDERLSAIKLRLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEVLRAQAAYIRA ILQAYRHN	BCMA	16,94
133	MGSWMEFDERLWAIKKRLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEFLRHQAAYIRM LLQAYRHN	BCMA	9,526
134	MGSWHEFDGRLSAIKRRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEHLRDKAAYIRY MLQAYRHN	BCMA	5,4
135	MGSWYEFDGRLQAIARLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEHLRFRAAYIRW	BCMA	3,29

	ILQAYRHN		
136	MGSWFEDKRLYAIHRLRALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKGNPEVEKLRYKAAIIRLY LQAYRHN	BCMA	11,82
137	MGSWVEFDNRLYAIVDRLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEHLRQKAAAYIRL ILQAYRHN	BCMA	11,7167
138	MGSWIEFHQRLNAIFNRLRALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKGNPEVEWLRHHAAYIRE MLQAYRHN	BCMA	7,34167
139	MGSWNEFRLRLWAITERLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVECLRAEAAWIRT MLQAYRHN	BCMA	3,87179
140	MGSWYEFWLRLSAISYRLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEWLRKEAAEIRS WLQAYRHN	BCMA	14,4653
141	MGSWYEFQLRLWAIHWRLIALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEWLRMRAAEIR NELQAYRHN	BCMA	20,59
142	MGSWYEFahrLEAIEWRLIALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRQYAAAIRN YLQAYRHN	BCMA	9,48
143	MGSWYEFDTRLGAI RNRLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEWLRFQAAYIRF LLQAYRHN	BCMA	13,934
144	MGSWYEFWVRLTAIRWRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEWLREQAASIR WVLQAYRHN	BCMA	5,72
145	MGSWFEDRRLKAIDRRLMALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEWLRMQAAIIRN YLQAYRHN	BCMA	6,1625
146	MGSWVEFWERLDAIDNRLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEWLRWHAAYIR GYLQAYRHN	BCMA	11,42

147	MGSWAEFWDRLDAIDSRLNALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLREWAAYIR GYLQAYRHN	BCMA	18,22
148	MGSWAEFDLRLRAIAKRLVALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEMLRDLAAYIR GVLQAYRHN	BCMA	4,09
149	MGSWSEFWDRLYAIRIRLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRSVAARIRN WLQAYRHN	BCMA	12,52
150	MGSWSEFWFRLGAIRNRLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRDVAahirh WLQAYRHN	BCMA	14,93
151	MGSWSEFNDRDLAIRWRDLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRQVAATIR YRLQAYRHN	BCMA	13,59
152	MGSWVEFWDRLGAIRERLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRYTAAAIRH YLQAYRHN	BCMA	5,22
153	MGSWAEFWDRLGAIRERLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRYTAAAIRH YLQAYRHN	BCMA	
154	MGSWTEFWDRLGAIRERLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRYTAAAIRH YLQAYRHN	BCMA	
155	MGSWVEFWDRLGAIRERLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLKYTAAAIRH YLQAYRHN	BCMA	
156	MGSWVEFWDRLGAIRERLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLQYTAAAIRH YLQAYRHN	BCMA	
157	MGSWVEFWDRLGAIRERLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRYTAAAIKH YLQAYRHN	BCMA	
158	MGSWAEFWDRLGAIRERLQALGGSEAELAAFE	BCMA	

	KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLQYTAAAIKH YLQAYRHN		
159	MGSWTEFWDR LGAIRERLQALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLQYTAAAIKH YLQAYRHN	BCMA	
160	MGSWVEFWDR LGAIRERLEALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLRYVAAVIRH RLQAYRHN	BCMA	4,18
161	MGSWVEFWDR LGAIRERLQALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEELRASAAAIRI ALQAYRHN	BCMA	3,07
162	MGSWVEFWDR LGAIRERLDALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEELRNTAAYIRT FLQAYRHN	BCMA	16,034
163	MGSWSEFWVRLGAIRERLDALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEALRVTA AQIRH YLQAYRHN	BCMA	23,5
164	MGSWSEFWVRLGAIRERLDALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLRYTAATIRR FLQAYRHN	BCMA	7,55667
165	MGSWSEFWARLGAIRERLDALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLRYTAATIRR FLQAYRHN	BCMA	
166	MGSWSEFWVRLGAIRERLDALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLRYTAGTIRR FLQAYRHN	BCMA	
167	MGSWSEFWVRLGAIRERLDALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLRYTAATIKR FLQAYRHN	BCMA	
168	MGSWSEFWARLGAIRERLDALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLRYTAGTIKR FLQAYRHN	BCMA	
169	MGSWSEFWDR LTAIRVRLDALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLRYTAAHIRK	BCMA	16,14

	FLQAYRHN		
170	MGSWTEFWTRLNAIYERLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRFTAASIRM YLQAYRHN	BCMA	8,43
171	MGSWFEFWDRLAAIRDRLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRYVAAKIRV RLQAYRHN	BCMA	12,78
172	MGSWTEFWVRLNAIRDRLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRHTAAIIRN YLQAYRHN	BCMA	12,53
173	MGSWVEFWHRLGAIYDRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRRTAALIRQ TLQAYRHN	BCMA	19,904
174	MGSWVEFWNRLGAIYDRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRHTAAVIRL YLQAYRHN	BCMA	14,55
175	MGSWSEFWERLEAIYDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRRTAATIRSF LQAYRHN	BCMA	18,78
176	MGSWEEFDNRLEAIFDRLEALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELREFAATIRITL QAYRHN	BCMA	3,93
177	MGSWMEFWDRLYAIEFRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRRTAATIRN ELQAYRHN	BCMA	11,6925
178	MGSWTEFWERLYAIEYRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRVAATIRY ELQAYRHN	BCMA	12,7
179	MGSWNEFWERLYAIELRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRMTAA YIR NELQAYRHN	BCMA	9,945
180	MGSWYEFWKRLYAIEYRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEALRKVAAKIRE QLQAYRHN	BCMA	14,785

181	MGSWTEFWARLYAIEMRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEHLRRAALIRE QLQAYRHN	BCMA	12,46
182	MGSWHEFWDRLYAIEFRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRQVAAKIR WHLQAYRHN	BCMA	7,3
183	MGSWDEFEFRLGALRWRLIALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRFGAHIRH ILQAYRHN	BCMA	9,2
184	MGSWTEFYHRLYAIRERLSALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRFGAHIRH LLQAYRHN	BCMA	9,6275
185	MGSWVEFETRLDAIRMRLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRFGAHIRA LLQAYRHN	BCMA	14,0717
186	MGSWGEFDVRLFAIRERLSALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRGYAAQIRSF LQAYRHN	BCMA	7,35333
187	MGSWVEFDERLSAIRERLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRLYAAQIRV FLQAYRHN	BCMA	5,61
188	MGSWSEFDGRLGAIWDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLDRDRAAQIRE FLQAYRHN	BCMA	10,0305
189	MGSWGEFEGRLHAIRSRLSALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRGYAAWIRA LLQAYRHN	BCMA	6,17
190	MGSWGEFNGRLGAIRERLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRAYAASIRA VLQAYRHN	BCMA	4,95333
191	MGSWWEFTFRLAAIEFRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRAIAAEIRK SLQAYRHN	BCMA	5,75
192	MGSWDEFQFRLAAIGFRLGALGGSEAELAAFE	BCMA	6,155

	KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEVLRRQAARIRH LLQAYRHN		
193	MGSWYEFVTRLHAIDHRLKALGGSEADLAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEWLRFYAAGIR MNLQAYRHN	BCMA	4,12
194	MGSWSIEFWRLEAIKFRLIALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKGNPEVEFLRVEAAAIRRV LQAYRHN	BCMA	8,43
195	MGSWGEFEHRLDPSTCVWLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEKLRRGAAVIRH WLQAYRHN	BCMA	4,05
196	MGSWIEFAMRLEAIENRLTALGGSEAELAIFES MIAHFEELLQNYKGGKGNPEVEALIHEAFAIHKE LWAYRHN	BCMA	10,73
197	MGSWNEFYQRLEAIENRLQALGGSEAELAMFE VRIALFEDMLQGYKGGKGNPEVEALKQEAIILR ELIAYRHN	BCMA	6,01
198	MGSWNEFYDRLRAIKKRLYALGGSEAELADFE EDIAQFEVDLQDYKGGKGNPEVEALHREAHAIT HELWAYRHN	BCMA	12,36
199	MGSWGEFKHRLALIKWYLEALGGSEAELAHFE DWIAVFEVQLQNYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	17,09
200	MGSWYEFKHRLAIKWYLEALGGSEAELAKFE AWIAEFEMILQRYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	5,505
201	MGSWYEFKHRLAIKWYLEALGGSEAELAHFE QYIADFEGLQKYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	14,8333
202	MGSWYNFKHRLAIKWYLEALGGSEAELARFE NFIANFETQLQLYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	6,7615
203	MGSWFQFKHRLAIKWQLEALGGSEAELAWFE QWIADFEHQLQHYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR	BCMA	10,39

	DELQAYRHN		
204	MGSWYNFKHRLAIKWFLAELGGSEAELAVFE VWIADFEHQLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	16,38
205	MGSWDAFKHRLALIKWYLEALGGSEAELAHFE EYIAEFESNLQSYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	12,98
206	MGSWDGFKHRLALIKWYLEALGGSEAELANFE NWIAEFEQRLQYYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	23,62
207	MGSWNGFKHRLAIKWYLEALGGSEAELASFE SYIAEFESGLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	16,53
208	MGSWNSFKHRLALIKWYLEALGGSEAELATFE WYIASFESELQQYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	10,34
209	MGSWSDFKYRLAVIKFYLEALGGSEAELASFES FIAHFEDDLQKYKGGKNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	BCMA	13,04
210	MGSWSGFKYRLAVIKFYLEALGGSEAELASFEL FIAKFEIDLQNYKGGKNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	BCMA	13,066
211	MGSWYGFKYRLAVIKWYLEALGGSEAELASFE KYIAHFEHDLQAYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	9,05
212	MGSWYGFKYRLAVIKWYLEALGGSEAELASFE KYIAQFEHDLQAYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	7,63333
213	MGSWYGFKYRLALIKWYLEALGGSEAELASFE TYIADFEDLLQAYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	13,03
214	MGSWSTFKYHLAVIKWYLEALGGSEAELASFE DYIAQFETDLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	11,65

215	MGSWHEFKYRLALIKWYLEALGGSEAELATFE HHIAQFEWDLQKYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	16,19
216	MGSWNMFKYRLAHIKWYLEALGGSEAELATF EAYIADFEVDLQKYKGKGNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	BCMA	16,33
217	MGSWHGFKYRLAIIKWLEALGGSEAELAFFE EWIASFERDLQIYKGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	6,025
218	MGSWHGFKYRLAVIKWYLEALGGSEAELAMF EGWIAQFEITLQQYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	5,99
219	MGSWQGFKYRLAVIKWMLEALGGSEAELAFF ENWIAEFETKLQQYKGKGNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	BCMA	7,75
220	MGSWSGFKYRLAVIKWYLEALGGSEAELATFE EWIAEFETELQFYKGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	13,975
221	MGSWGYFKYRLAMIKWYLEALGGSEAELASF ESWIAEFEGSLQAYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	13,018
222	MGSWHAFKYKLAMIKWYLEALGGSEAELAHF EEWIAEFEALLQEYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	11,63
223	MGSWQHFKYRLAIIKWYLEALGGSEAELAFFE SFIKFEHDLQKYKGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	8,91
224	MGSWNDFKYRLAIIKYYLEALGGSEAELAHFES YIASFEHDLQNYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	BCMA	15,1233
225	MGSWGAFKYRLAIIKFYLEALGGSEAELARFEE FIANFEHDLQNYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	BCMA	12,88
226	MGSWYNFKYRLAIIKFYLEALGGSEAELAQFEI	BCMA	19,91

	WIAEFEHDLQGYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN		
227	MGSWEQFKYRLAIKYMLEALGGSEAELAWFE SWIANFESDLQHYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	11,01
228	MGSWQQFKYRLAIKYYLEALGGSEAELAGFE TYIAKFEEVLQSYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN	BCMA	15,12
229	MGSWAGFKYRLAVIKYYLEALGGSEAELAHFE QWIAHFEGMLQDYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	12,68
230	MGSWTAFKYRLAIKFYLEALGGSEAELAHFES YIAHFEDMLQHYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN	BCMA	7,43
231	MGSWAHFKYRLAIKFWLEALGGSEAELANFE EYIAEFESTLQVYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN	BCMA	13,12
232	MGSWANFKYRLALIKWHLEALGGSEAELASFE IWIADFEESLQWYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	14,2878
233	MGSWATFKYRLALIKWHLEALGGSEAELADFE EYIAGFEEGLQKYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	15,07
234	MGSWTHFKYRLALIKWWLEALGGSEAELAGF EVHIADFEAQLQMYKGGKGNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	BCMA	7,36692
235	MGSWNTFKYHLAVIKFMLEALGGSEAELAFFE QWIAEFEVTLQSYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	10,6006
236	MGSWTQFKYHLAVIKWYLEALGGSEAELAGFE QWIAEFEKTLQEYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	21,1178
237	MGSWNQFKYRLAVIKFYLEALGGSEAELAHFE TWIAAFEEQLQFYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR	BCMA	12,85

	DELQAYRHN		
238	MGSWNEFKYHLAVIKFYLEALGGSEAELAHFE TWIAEFEYELQKYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	13,68
239	MGSWVQFKYHLAVIKFYLEALGGSEAELAHFE TWIAEFEVALQGYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	12,6957
240	MGSWVDFKYHLAVIKFWLEALGGSEAELANFE TWIANFEQELQMYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	13,22
241	MGSWVDFKYHLAVIKWYLEALGGSEAELADF ENWIAHFESILQQYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	10,43
242	MGSWVEFKYHLAVIKFTLEALGGSEAELADFE EEIARFEMILQQYKGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	6,92
243	MGSWSHFKYHLALIKWYLEALGGSEAELAKFE FWIAEFEHNLQMYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	7,93
244	MGSWYHFKYHLALIKWYLEALGGSEAELAHFE HWIAEFEWTLQQYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	8,85
245	MGSWQGFKYHLALIKFYLEALGGSEAELAHFE HWLAEFEHDLQTYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	21,2
246	MGSWLSFKHHLALIKWYLEALGGSEAELASFE AWIALFEHQLQQYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	6,305
247	MGSWSEFKYKLALIKWYLEALGGSEAELAHFE GWIANFETTLQKYKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	11,2875
248	MGSWIEFKYKLAIIFYLEALGGSEAELAHFEH WIADFEFVLQQYKGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	14,88

249	MGSWQNFKYHLAMIKWYLEALGGSEELANF EEFIAQFEINLQHYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	9,55
250	MGSWYNFKYHLAIKWWLEALGGSEELADFE HYIADFERNLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	8,62636
251	MGSWYQFKYHLAIKWYLEALGGSEELAGFE NYIATFEQELQQYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	18,41
252	MGSWSHFKYHLAIKFYLEALGGSEELAGFEI WIAKFEDELQMYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	9,34
253	MGSWVGFKAHLAIKWYLEALGGSEELAGFE IFIADFEALLQMYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	9,71
254	MGSWVNFKYKLAIIKYMLEALGGSEELAFFE DWIAEFERTLQQYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	7,38951
255	MGSWSNFKYRLAVIKYMLEALGGSEELAFFE DWIADFELHLQVYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	9,34
256	MGSWTNFKYKLAVIKFMLEALGGSEELAFFE DWIAGFEIDLQNYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	11,4075
257	MGSWTGFKYRLAIKFMLEALGGSEELAFFEQ WIADFENELQYYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	13,89
258	MGSWHNFKYRLAIKFMLEALGGSEELAWFE NWIADFEDSLQDYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	13,59
259	MGSWFAFKHRLAVIKYMLEALGGSEELAFFE HWIAQFEHDLQQYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	11,985
260	MGSWYEFKHRLAVIKYMLEALGGSEELAFFE	BCMA	3,71

	NWIAQFEHELQTYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN		
261	MGSWYKFKHKLAVIKYMLEALGGSEAELAWF EEWIAEFEVTLQDYKGGKNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	BCMA	4,54
262	MGSWFYFKQKLAFIKWYLEALGGSEAELANFE IYIAEFEVMLQQYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	7,23
263	MGSWFSFKHHLAVIKWNLEALGGSEAELASFE EQIAEFESVLQAYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	6,45
264	MGSWGNFKYRLAIKFKHLEALGSSEAELATFEA WIANFESMLQNYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	22,7
265	MGSWSYFKYGLAIKIRLEALGGSEAELADFER WIAAFEHDLQYYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	13,33
266	MGSWSYFKFGLAHIKLRLEALGGSEAELADFE QWIASFEEQLQTYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	18,354
267	MGSWSYFKWGLAHIKLRLEALGGSEAELADFE FWIAEFEGLLQDYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	17,64
268	MGSWIYFKYGLAHIKTRLEALGGSEAELADFE QWIAEFEKMLQDYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	21,12
269	MGSWGYFKYGLATIKHRLEALGGSEAELADFE LWIAKFEEQLQVYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	14,01
270	MGSWEYFKYGLATIKMHLEALGGSEAELADFE HWIAHFEHQLQMYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	18,4033
271	MGSWSYFKYGLATIKEKLEALGGSEAELADFE TWIAMFEKQLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIR	BCMA	18,15

	DELQAYRHN		
272	MGSWHYFKNGLAIKEKLEALGGSEAEADFEI WIAMFEMELQEYKKGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	19,85
273	MGSWQYFKYGLAIKIKLEALGGSEAEADFEA WIATFEKQLQHYKKGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	10,28
274	MGSWVYFKHGLAVIKMRLEALGGSEAEADFE TWIAQFEMTLQEYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	21,45
275	MGSWVYFKYGLAVIKEKLEALGGSEAEADFE TWIAEFEFGLQQYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	17,58
276	MGSWYYFKYGLAVIKGKLEALGGSEAEADFE TWIAKFENHLQSYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	3,84
277	MGSWTYFKYGLALIKYRLEALGGSEAEADFE EWIAQFEVSLQHYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	15,21
278	MGSWDYFKYGLALIKIKLEALGGSEAEADFE VWIAQFEMALQVYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	15,76
279	MGSWTYFKFGLAHIKDSLEALGGSEAEADFE QWIAMFEQDLQVYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	17,01
280	MGSWGYFKHGLAHIKSSLEALGGSEAEADFE VWIAAFENELQEYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	18,505
281	MGSWGYFKTGLAIKKAQLEALGGSEAEADFE WIAQFEETLQFYKKGKGNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	BCMA	12,75
282	MGSWAYFKYGLAVIKLHLEALGGSEAEADFE RYIAEFYELQAYKKGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	13,44

283	MGSWLDFKEGLADIKRSLEALGGSEAELADFE GVIALFEWKLQTYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	3,03
284	MGSWEVFKHELAVIKDYLEALGGSEAELAHFE WGIAWFEGFLQDYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	9,33
285	MGSWIVFKQSLAWIKEHLEALGGSEAELAEFEF YIANFEHTLQNYKKGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	10,57
286	MGSWIYFKDSLAYIKKYLEALGGSEAELATFEY YIANFEHELQYYKKGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	3,2
287	MGSWDHFKYNLAWIKKYLEALGGSEAELATFE WYIANFEKRLQDYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	9,81
288	MGSWFTFKQNLAWIKLHLEALGGSEAELARFE YYIADFENKLQLYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	14,204
289	MGSWREFKYGLAHIKRVLEALGGSEAELAVFE YYIAKFEQELQEYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	14,7
290	MGSWIQFKYGLAHIKRTLEALGGSEAELAVFE WYIADFEQQLQGYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	8,35667
291	MGSWVEFKHNLAWIKVTLEALGGSEAELAVFE YYIAQFEEQLQEYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	15,83
292	MGSWISFKDNLAMIKEFLEALGGSEAELAVFE WYIATFEVELQDYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	7,16
293	MGSWHIFKDNLATIKAFLEALGGSEAELAVFE WYIAKFEELQGYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	3,47
294	MGSWTSFKHGLAGIKRVLEALGGSEAELATFE	BCMA	9,765

	WYIAQFERHLQAYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN		
295	MGSWQSFKHALADIKINLEALGGSEAELAQFE YAI AVFEYRLQAYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	13,7188
296	MGSWHTFKEALAQIKGELEALGGSEAELASFE YAI AVFEYRLQMYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	6,76
297	MGSWTFKTSRADIKAELEALGGSEAELAKFE YYIAIFEYRLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	18,76
298	MGSWTNFKEGLAEIKRDLEALGGSEAELARFE YVIAVFEFRLQNYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	12,3267
299	MGSWHTFKDGLAEIKSELEALGGSEAELAMFE YVIAIFEYRLQNYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	10,65
300	MGSWQFFKEHLASIKFWLEALGGSEAELAFFE DAIADFEYHLQNYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	10,58
301	MGSWTYFKEHLASIKFWLEALGGSEAELAFFE DAIAEFEKDLQYYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	6,59507
302	MGSWIIFKGYLAHIKHHLEALGGSEAELADFEF YIAIFEMELQKYKGGKNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	BCMA	5,18
303	MGSWYLFQSHLAHIKHHLEALGGSEAELAWFE FTIAGFEQELQHYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	BCMA	7,69
304	MGSWYSFKWTLARIKLELEALGGSEAELAYFE NVIAHFEMELQSYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	4,05
305	MGSWTTLKWRLAHIKQHLEALGGSEAELALFE YDIAHFEELLQYYKGGKNPEVEALRKEAAAIR	BCMA	17,82

	DELQAYRHN		
306	MGSWYGFKWYLATIKKHLEALGGSEAELALFE TEIATFELWLQDYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	BCMA	10,65
307	MGSWIEFNMRVLAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVESLRYEACLDP WSSAAYRHN	CD123	3,2
308	MGSWIEFHERLWAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVESLREMAASIRH GLQAYRHN	CD123	3,4
309	MGSWFEFYERLWAIDDRWLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEWLREEAASIRS SLQAYRHN	CD123	6
310	MGSWFEFWDRLEAIDDRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVESLRYNAAEIRK ELQAYRHN	CD123	4,9
311	MGSWHEFW SRLDAIDDRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEYLRGAAADIRA ELQAYRHN	CD123	3,8
312	MGSWYEFWIRLEAIDDRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVDILRDFAADIRT ELQAYRHN	CD123	10,4
313	MGSWHEFWDRLEAIDDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEFLREEAAYIRE LLQAYRHN	CD123	10,6
314	MGSWEEFWDRLEAIDDRWLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVETLRNEAAEIRM ALQAYRHN	CD123	3,1
315	MGSWWEFDDRLFAIDTRLMALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVESLREWAATIRM ELQAYRHN	CD123	3,5
316	MGSWTEFHDRLEAIDDRWLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEYLRREEAAQIRW ELQAYRHN	CD123	5,8

317	MGSWAEFEDRLWAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLREEAAAIRF ELQAYRHN	CD123	6,2
318	MGSWVEFWFRLEAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLREEAAAIRE DLQAYRHN	CD123	3,2
319	MGSWVEFWQRLEAIESRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLREEAAEIRW ELQAYRHN	CD123	7,7
320	MGSWSEFWQRLEAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRENAAMIR DELQAYRHN	CD123	4,7
321	MGSWSEFITRLEAIDDRWLWALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEILREEAAEIRQHL QAYRHN	CD123	3,3
322	MGSWYEFETRLEAIYDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVELLRVEAAEIRE DLQAYRHN	CD123	3,2
323	MGSWTEFYRLEAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRVEAANIRD MLQAYRHN	CD123	7,5
324	MGSWYEFVIRLEAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRWYAADIR HELQAYRHN	CD123	6,4
325	MGSWTEFSIRLEAIYDRLVALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRTYAANIRHE LQAYRHN	CD123	11,9
326	MGSWTEFSIRLEAIYDRLVALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRTYAAFIRHE LQAYRHN	CD123	10,2
327	MGSWTEFVWRLEAIWDRDLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRDAAVIRH FLQAYRHN	CD123	3,6
328	MGSWVEFHERLEAIEDRLMALGGSEAELAAFE	CD123	3,7

	KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEYLREDAAFIRQ LLQAYRHN		
329	MGSWVEFHDRLEAIEDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEWLREDAAYIRS ILQAYRHN	CD123	4,6
330	MGSWIEFYDRLEAIYDRLDALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGKGNPEVEWLREDAAFIRSW LQAYRHN	CD123	7,5
331	MGSWVEFDQRLEAIYDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEWLREDAAQIR KWLQAYRHN	CD123	5,1
332	MGSWVEFHDRLEAIEDRLLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEDLREYAAGIR WFLQAYRHN	CD123	3,3
333	MGSWEEFAQRLYAIEWRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEVLRVAAQIRY HLQAYRHN	CD123	16,9
334	MGSWDEFWRLDVIFARLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEELRKNAAQIRD GLQAYRHN	CD123	4,6
335	MGSWDEFYYRLEAIEMRLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEELRHVAAQIRH MLQAYRHN	CD123	7,2
336	MGSWEEFYDRLEAIYNRLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEVLREYAADIRE MLQAYRHN	CD123	18,6
337	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGGEEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEALRKEAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
338	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEALRKEAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
339	MGSWDEFGRRLYAIIETQLYALGGGEEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLRVIAAVIRE	CD123	

	NLQAYRHN		
340	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGEEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLREIAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
341	MGSWDEFGRRLYAIAKWQLYALGGEEAELAAF EKEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLREIAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
342	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGEEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLRKIAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
343	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGEEAELAAF EKEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLREIAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
344	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLREIAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
345	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGEEAELAAF EKEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLREIAAVIRS NLQAYRHN	CD123	
346	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLREIAAVIRS NLQAYRHN	CD123	
347	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGEEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLREIAAVIRS NLQAYRHN	CD123	
348	MGSWDEFGRRLAAIEWQLYALGGEEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLREIAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
349	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGEEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEALREIAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
350	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGEEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLREEAAVIRE NLQAYRHN	CD123	

351	MGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGSPEVEKLREIAAVIRSN LQAYRHN	CD123	
352	MGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLREIAAVIRS NLQAYRHN	CD123	5,8
353	MGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGEEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLREIAAVIRS NLQAYRHN	CD123	
354	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLREIAAVIRS NLQAYRHN	CD123	
355	MGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLREIAAVIRS NLQAYRHN	CD123	
356	MGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLREIAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
357	MGSWDEFGRRLAAIKTQLAALGGEEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLREIAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
358	MGSWDEFGRRLAAIKTQLAALGGTEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLREIAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
359	MGSWDEFGRRLAAIKTQLAALGGEEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEALRKEAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
360	MGSWDEFGRRLAAIKTQLAALGGTEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEALRKEAAVIRE NLQAYRHN	CD123	
361	MGSWDEFQRLIAIEERLALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLREEAAVIRKY LQAYRHN	CD123	5,9
362	MGSWVEFDQRLGAIWDRDLVALGGSEAELAAFE	CD123	5,3

	KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEHLRQGAAVIRD DLQAYRHN		
363	MGSWVEFDMRLSAIWERLIALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLREDAAEIRE FLQAYRHN	CD123	3,3
364	MGSWVEFDQRLDAIYERLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRDEAAEIRE HLQAYRHN	CD123	10,5
365	MGSWHEFDQRLWAIIEERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVETLRLYAALIRH DLQAYRHN	CD123	3,3
366	MGSWVEFWDRLDAIEGRLWALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRWLAAEIR ADLQAYRHN	CD123	3,5
367	MGSWVEFY SRLDAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRIAAASIRE DLQAYRHN	CD123	9,4
368	MGSWYEFYERLDAIEERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRDWAAWIR EDLQAYRHN	CD123	8,4
369	MGSWFEFDDRLWAIENRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRDNAAWIR EILQAYRHN	CD123	4,2
370	MGSWYEFWDRLDALEDRLWALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRDSA AFIR EELQAYRHN	CD123	9,7
371	MGSWMEFVDRLDAIESRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRIEAAFIRE ELQAYRHN	CD123	5,8
372	MGSWDEFVDRLWAIIEERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRIQAAIIREA LQAYRHN	CD123	6
373	MGSWFEFNRYRLGAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEMLRQIAAEIRE	CD123	6,9

	FLQAYRHN		
374	MGSWEEFFTRLDAINERLEALGGSEAEAAFEK EIAAFESELQAYKKGKNPEVEMLRYEAAEIRH MLQAYRHN	CD123	3,9
375	MGSWYEFNRLDAIGERLWALGGSEAEAAFE KEIAAFESELQAYKKGKNPEVEILRHQAAEIRW FLQAYRHN	CD123	3,9
376	MGSWYEFWGRDLAIEERLWALGGSEAEAAFE KEIAAFESELQAYKGRGNPEVEMLRDEAAEIRG QLQAYRHN	CD123	5,4
377	MGSWVEFWDRLWAIDYRLFALGGSEAEAAAF EKEIAAFESELQAYKKGKNPEVEALRDEAAWIR EELQAYRHN	CD123	3,6
378	MGSWVEFVDRLWAIDERLDALGGSEAEAAFE KEIAAFESELQAYKKGKNPEVEFLRTWAAWIR EDLQAYRHN	CD123	3,2
379	MGSWFEFWDRLEAIWERLDALGGSEAEAAFE KEIAAFESELQAYKKGKNPEVEELRREAAIRED LQAYRHN	CD123	10,3
380	MGSWFEFEDRLEAIYQRDLALGGSEAEAAFE KEIAAFESELQAYKKGKNPEVEWLRDEAAWIR SDLQAYRHN	CD123	5,5
381	MGSWFEFHDRLWAIDERLWALGGSEAEAAFE KEIAAFESELQAYKKGKNPEVEILREEAADIRLD LQAYRHN	CD123	3,5
382	MGSWYEFEDRLWAIDNRLWALGGSEAEAAAF EKEIAAFESELQAYKKGKNPEVEELRVHAADIR DDLQAYRHN	CD123	4,9
383	MGSWFEFQDRLWAIDNRLWALGGSEAEAAAF EKEIAAFESELQAYKKGKNPEVEELRDHAAMIR WELQAYRHN	CD123	3,2
384	MGSWDEFEERLFAIDERLWALGGSEAEAAFE KEIAAFESELQAYKKGKNPEVEALRYLAADIRE ELQAYRHN	CD123	5

385	MGSWEEFWERLDAIDTRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRNDAADIRE PLQAYRHN	CD123	6,8
386	MGSWMEFWERLEAIDMRLWALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRDDAAVIR DDLQAYRHN	CD123	4,2
387	MGSWLEFMWRLDAIDERLWALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVELLREMAAAIR DDLQAYRHN	CD123	5,1
388	MGSWTEFYNRDLAIDQRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEMLREYAADIRT DLQAYRHN	CD123	3,3
389	MGSWWEFIWRLEAIEQRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRRAADIRT DLQAYRHN	CD123	4
390	MGSWSEFYDRLWAIEERLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRYYAAEIRE ELQAYRHN	CD123	17
391	MGSWSEFEDRLWAIDQRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRAYAADIR WELQAYRHN	CD123	4,2
392	MGSWTEFWERLNAIDERLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRLYAAEIRS ELQAYRHN	CD123	4
393	MGSWWEFEERLWAIDYRLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEMLRSWAAEIR ALLQAYRHN	CD123	4,1
394	MGSWWEFENRLWAIEERLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEMLRNYAAEIR WELQAYRHN	CD123	5,6
395	MGSWVEFEERLWAIDERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRDWAADIR WWLQAYRHN	CD123	4,1
396	MGSWVEFEERLEAIEERLFALGGSEAELAAFEK	CD123	3,8

	EIAAFESELQAYKGGKNPEVEWLRDDAANIRH WLQAYRHN		
397	MGSWMEFEERLWAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEWLRSEAAWIR MELQAYRHN	CD123	3,2
398	MGSWSEFEHRLEAIESRLFALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKNPEVEDLRSEAAWIREQ LQAYRHN	CD123	7,6
399	MGSWFEFWERLDAIEWRLWALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKGGKNPEVEELRSTAADIR RYLQAYRHN	CD123	3,4
400	MGSWFEFWGRLEAIESRLKALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEELREHAAWIRA YLQAYRHN	CD123	4,9
401	MGSWQEFMRLDAIYNRLETLGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEWLRQSAANIRS ELQAYRHN	CD123	13,7
402	MGSWSEFNMRLDAIYERLTALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEWLRHSAARIRL ELQAYRHN	CD123	13,7
403	MGSWSEFNMRLDAIYERLTALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEWLRHSAALIRL ELQAYRHN	CD123	11,4
404	MGSWIEFNMRLDAIYERLVALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEWLRKVAANIR LELQAYRHN	CD123	11,4
405	MGSWYEFHHRLDAIYERLLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEWLRSSAANIRK ELQAYRHN	CD123	11,9
406	MGSWYEFKRLDAIYERLVALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEWLRSSAANIRE ELQAYRHN	CD123	15,3
407	MGSWTEFYVRLDAIYERLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEWLRMVAANIR	CD123	16

	TELQAYRHN		
408	MGSWVEFYTRLDAIYGRLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRQVAANIR MELQAYRHN	CD123	14,4
409	MGSWVEFHMLRLDAIYERLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRRTAAANIR VELQAYRHN	CD123	9,1
410	MGSWYEFAIRLDAIYERLHALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRVWAANIRTE LQAYRHN	CD123	25,5
411	MGSWNEFVIRLDAIYERLLALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRMAAANIRM ELQAYRHN	CD123	16,6
412	MGSWSEFYVRVDAIYARLSALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRVWAANIR HELQAYRHN	CD123	14,7
413	MGSWSEFHVRLDAIYARLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVERLREWAANIRR ELQAYRHN	CD123	14,4
414	MGSWVEFHLRLDAIYGRLMALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLRVWAANIR NELQAYRHN	CD123	17,5
415	MGSWVEFEMRLDAIVGRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRRWAANIRS ELQAYRHN	CD123	25,3
416	MGSWVEFNIRLDAIYERLYALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRHWAASIRRE LQAYRHN	CD123	13,4
417	MGSWHEFGVRLDAIYDRLMALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRQAAANIRS ELQAYRHN	CD123	15,6
418	MGSWTEFNRLRLDAIYDRLMALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRASAAAIR VELQAYRHN	CD123	14,4

419	MGSWTEFNLRLDAIYGRLSALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEFLRAAAANIRV ELQAYRHN	CD123	19,3
420	MGSWVEFNWRLDAIYDRLVALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEWLRVSAKIR GELQAYRHN	CD123	9,3
421	MGSWNEFAWRLDAIYSRLAALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEWLRVAAANIR YELQAYRHN	CD123	17,7
422	MGSWTEFAWRLDAIYDRLLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEWLRHVAAANIR RELQAYRHN	CD123	16,1
423	MGSWVEFSIRLDAIYTRLVALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGKGNPEVEMLRKGAANIRK ELQAYRHN	CD123	15,1
424	MGSWVEFYIRLDAIYVRLMALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLRSYAANIRQ ELQAYRHN	CD123	16,1
425	MGSWYEFMRLDAIYDRLMALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEQLRGYAANIRN ELQAYRHN	CD123	13
426	MGSWVEFYIRLDAIYDRLEALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGKGNPEVEVLRRYAANIRNE LQAYRHN	CD123	17
427	MGSWIEFEVRLDAIYNRLAALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGKGNPEVERLRRYAANIRHE LQAYRHN	CD123	20,8
428	MGSWFEFYDRLDAIYMRLIALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEVLRRYAANIRA ELQAYRHN	CD123	13,6
429	MGSWFEFYMRLDAIYDRLTALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVERLRTFAANIRK ELQAYRHN	CD123	13,1
430	MGSWYEFDYRLDAIYDRLAALGGSEAELAAFE	CD123	24,9

	KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVERLRKWAANIR EELQAYRHN		
431	MGSWSEFYLRDLDAIYDRDLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRKTAANIRE ELQAYRHN	CD123	15,7
432	MGSWFEFYERLDAINWRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEALRGEAAAIRE DLQAYRHN	CD123	3
433	MGSWNEFEDRLDAIWWRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEALRVEAAFIRT MLQAYRHN	CD123	5,1
434	MGSWFYFKDDLADINYMLEALGGSEAELAMF EDDIAGFELTLLKYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,7
435	MGSWHFFKDDLAWIKNELEALGGSEAELAMFE DDIAMFETMLQSYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,2
436	MGSWHWFKTDLADIKEELEALGGSEAELAMFE DDIAEFEEFLQMYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,5
437	MGSWWLFKDDLAEIKYWLEALGGSEAELAFFE DDIAEFERGLQIYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN	CD123	3,3
438	MGSWYEFKDDLAEIKEWLEALGGSEAELAFFE LDIADFEWLLQLYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,8
439	MGSWQWFKDDLAYIKETLEALGGSEAELALFE DMIADFEFELQWYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	6,3
440	MGSWILFKDDLAWIKETLEALGGSEAELAFFED NIADFEELQGYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN	CD123	6
441	MGSWIVFKDDLADIKRWLEALGGSEAELAMFE DEIADFEWQLQDYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR	CD123	3,9

	DELQAYRHN		
442	MGSWGHFKQDLAWIKDTLEALGGSEAELAFFE DDIAMFEMELQDYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	4,9
443	MGSWGYFKDDLAWIKGELEALGGSEAELAEFE WFIAVFEEDLQVYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	4,5
444	MGSWYWFKDDLAEIKGLLEALGGSEAELAEFE DEIAVFEQELQEYKKGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	10,4
445	MGSWMFFKEDLADIKWALEALGGSEAELAFFE EEIALFEQHLQYKKGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	3,2
446	MGSWTFFKEDLAGIKWELEALGGSEAELAWFE DEIALFEEELQEYKKGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	7
447	MGSWVFFKDDLADIKDELEALGGSEAELAFFEI AIALFEWELQEYKKGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	8,8
448	MGSWTFFKNDLAEIKDWLEALGGSEAELADFE WDIAEFEYSLQEYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,9
449	MGSWTYFKDDLADIKQWLEALGGSEAELAFFE IEIAEFEELQEYKKGKNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	CD123	4,6
450	MGSWTVFKYDLADIKWWLEALGGSEAELADF EEEIAEFEELQEYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,9
451	MGSWYWFKQDLAHIKSMLEALGGSEAELAWF EEDIADFESELQEYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,3
452	MGSWTFFKWDLADIKANLEALGGSEAELAWF EEDLAGFEALQEYKKGKNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	CD123	4,8

453	MGSWSFFKEELANIQVYLEALGGSEAELAWFE EDIADFEEDLQHYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,8
454	MGSWEFFKYELADIKDELEALGGSEAELAWFE EDIATFEEWLQGYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,4
455	MGSWQTFKDELAHIKWELEALGGSEAELAWFE WDIANFEEELQEYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	5,5
456	MGSWYWFKEELAFIKWELEALGGSEAELALFE EDIAYFEEMLQEYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	9,4
457	MGSWNSFKDELAEIKAELEALGGSEAELAFFEE DIAWFEEHLQYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN	CD123	3,3
458	MGSWDLFKWELAEIKLGLLEALGGSEAELAEFE YDIAWFEEDLQDYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,4
459	MGSWIFFKQDLAEIKLNLEALGGSEAELAWFE DDIAWFESHQDYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,8
460	MGSWHLFKWTLAEIKYELEALGGSEAELAWFE DDIATFEEELQWYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	4
461	MGSWVTFKDELADIKDFLEALGGSEAELAFFE VDIAEFEAELQFYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN	CD123	7,6
462	MGSWVYFKDELADIKDFLEALGGSEAELAEFE EDIATFEYDLQWYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	4,6
463	MGSWETFKYELAEIKDYLEALGGSEAELAWFE DDIAEFEFELQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN	CD123	4,4
464	MGSWNTFKYELAEIKHFLEALGGSEAELAMFE	CD123	5

	DDIAMFEWELQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN		
465	MGSWYVFKDELAEIKQFLEALGGSEAELAWFE DDIAEFETQLQHYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	9,9
466	MGSWIFFKEQLAIKWELEALGGSEAELAWFED DIAAFEDDLQFYKGGGNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	CD123	15
467	MGSWEFFKEVLAEIKYDLEALGGSEAELAWFE TDIAGFEIDLQVYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	8,2
468	MGSWVFFKEDLATIKNDLEALGGSEAELAWFE MMIADFEADLQYYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,1
469	MGSWEEFKEDLAEIKVWLEALGGSEAELAWFE MGIADFEDGLQFYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	4,3
470	MGSWHWFKEDLANIKDWLEALGGSEAELAWF EDNIADFEGDLQVYKGGKNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	CD123	3,3
471	MGSWFWFKEDLAFIKEDLEALGGSEAELAWFE DGIAFFEWDLQDYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	13,7
472	MGSWQWFKEDLAEIKHDLEALGGSEAELAWF EDFIAQFEFDLQWYKGGKNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	CD123	3,8
473	MGSWHWFKEDLAIKQDLEALGGSEAELATFE QWIAEFEWDLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	5,5
474	MGSWNWFKEDLAIKMDLEALGGSEAELAWFE HNIAGFEFELQGYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	3,1
475	MGSWSWFKEDLAEIKMELEALGGSEAELAYFE WYIAEFEFQLQHYKGGKNPEVEALRKEAAAIR	CD123	4,8

	DELQAYRHN		
476	MGSWSWFKQDLADIKIQLEALGGSEAELAWFE WDIAEFEFELQDYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	4
477	MGSWSWFKEDLADIKFELEALGGSEAELAWFE LDIADFEQALQQYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	6,8
478	MGSWSWFKEDLASIKAVLEALGGSEAELAFFE SDIAEFEQELQYYKGGKNPEVEALRKEAAIRD ELQAYRHN	CD123	6,9
479	MGSWWEFKEDLAEIKWFLEALGGSEAELAWF EHDIAKFELQYYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	5,1
480	MGSWEWFKSDLASIKWELEALGGSEAELAWFE HDIAEFEDLQWYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	5,7
481	MGSWNEFKDDLAMIKMTLEALGGSEAELAWF EHDIAEFEDDLQWYKGGKNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	CD123	3,5
482	MGSWTFFKDDLAEIKWMLEALGGSEAELAWF ESDIAYFEDELQWYKGGKNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	CD123	3,3
483	MGSWSDFKDDLAEIKMILEALGGSEAELAYFE NDIAWFEDDLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	4,7
484	MGSWSMFKDDLAEIKASLEALGGSEAELAWFE DDIAWFEDDLQHYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	5,2
485	MGSWQYFKDDLAEIKMVLEALGGSEAELAWF EADIAMFEDDLQIYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,6
486	MGSWSFFKDDLAEIKYFLEALGGSEAELAMFE QTIAEFEYDLQDYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	10,1

487	MGSWMEFKEELAEIKYILEALGGSEAELAWFE QSIADFEYDLQDYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	5
488	MGSWAWFKEDLAEIKVFLEALGGSEAELAEFE VSIADFEYELQDYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	3,5
489	MGSWYEFKFDLAEIKEQLEALGGSEAELALFED DIAFFEYDLQNYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	CD123	4,6
490	MGSWYDFKYDLAEIKMDLEALGGSEAELAQFE FDIAFFEEELQDYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	3,2
491	MGSWYIFKEDLAEIKEELEALGGSEAELAYFEE EIALFEMELQWYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	11,1
492	MGSWVLFKEELAYIKFELEALGGSEAELALFEN VIAIFESNLQNYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	CD123	3,5
493	MGSWQDFKEDLAWIKYELEALGGSEAELAFFE YDIAIFENNLQHYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	3,2
494	MGSWDHFKNDLAWIKKHLEALGGSEAELAEFE AVIAYFELYLQGYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,3
495	MGSWYDFKEDLADIKWMLEALGGSEAELAEF ENVIAYFENDLQEYKGGKGNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	CD123	8
496	MGSWYMFKEELADIKWYLEALGGSEAELAWF EDDIAGFEWDLQAYKGGKGNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	CD123	7
497	MGSWYYFKDELADIKWDLEALGGSEAELAWF EMLIAQFELDLQWYKGGKGNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	CD123	4
498	MGSWMYFKDTLADIKWYLEALGGSEAELAFFE	CD123	3,1

	DWIAEFEDDLQVYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN		
499	MGSWYQFKHDLADIKYGLEALGGSEAELAWF EDDIADFELDLQYYKGGKNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	CD123	4,7
500	MGSWYVFKDDLADIKYMLEALGGSEAELAWF EWEIANFEFDLQYYKGGKNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	CD123	3,8
501	MGSWNFFKYDLADIMAYLEALGGSEAELAFFE DEIANFEHDLQKYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	4,4
502	MGSWHWFKIVLADIKDGLEALGGSEAELAYFE TTIADFEMDLQHYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	4,3
503	MGSWHWFKIVLADIKDGLEALGGSEAELAYFE TTIADFEMDLHHYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,5
504	MGSWFMFKEELADIKDWLEALGGSEAELASFE SYIAWFEQDLQWYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	5,7
505	MGSWFMFKQELAWIKEDLEALGGSEAELADFE WDIAEFEWDLQYYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	7,2
506	MGSWQIFKGELAYIKQYLEALGGSEAELAFFEF DIAEFEDDLQYYKGGKNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	CD123	4,7
507	MGSWDFEELAEIKHYLEALGGSEAELAFFEF WIADFEQDLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	3,7
508	MGSWFNFKEELAVIKFQLEALGGSEAELAFFE WVIADFEDDLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	6,1
509	MGSWYQFKTELAWIKDDLEALGGSEAELAWF EWVIADFEDDLQFYKGGKNPEVEALRKEAAAI	CD123	6,6

	RDELQAYRHN		
510	MGSWFEFKDYLDADIKWDLEALGGSEAELAIFE HDIAEFEHNLQQYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,8
511	MGSWVRFKDFLADIKMDLEALGGSEAELADFE YHIAEFEHNLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	5,8
512	MGSWWLFKEQLALIKYNLEALGGSEAELADFE SWIAEFEHQLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	4,1
513	MGSWHVFKTELADIKFYLEALGGSEAELAMFE LWIAEFEHELQDYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	5,4
514	MGSWIWFKDWLADIKDLLEALGGSEAELAEFE YDIALFEDQLQAYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	7,3
515	MGSWGWFKHELAFIKADLEALGGSEAELAWF EEEIAEFEYELQFYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,3
516	MGSWTWFKDNLAWIKEDLEALGGSEAELAWF ELEIASFETALQDYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	6,9
517	MGSWTYFKNDLAGIKEDLEALGGSEAELAQFE FEIAEFEWLLQDYKGGKNPEVEALRKEAAIRD ELQAYRHN	CD123	3,6
518	MGSWTWFKWDLADIKGDLEALGGSEAELAFF EEEIAEFEWRLQDYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	5,9
519	MGSWLYFKEYLADIKSDLEALGGSEAELAWFE YEIADFEEQLQYYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,7
520	MGSWHWFKEELAEIKEDLVALGGSEAELAWFE YDIAMFELSLQNYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,1

521	MGSWNDFKEELAWIKFDLEALGGSEAELAWFE EDIAMFEQQLQAYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	3,8
522	MGSWWDFKDWLAEIKHDLEALGGSEAELALF ESEIADFEFGLQWYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	4,2
523	MGSWDEFKEDLAHIKTDLEALGGSEAELALFE DEIADFEMYLQHYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	6,3
524	MGSWDFFKYDLANINEWLEALGGSEAELADFE YGIADFELWLQDYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	5,5
525	MGSWYQFKDDLAIKHLLEALGGSEAELAVFE YIIADFESFLQIYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	CD123	4
526	MGSWAEFKHDLADIKRELEALGGSEAELAWFE LSIAFFEDELQHYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	3,3
527	MGSWVVFQDLADINHQLEALGGSEAELAWF EWEIADFELQHYKGGKGNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	CD123	3,6
528	MGSWFQFKEFLAMITHNLEALGGSEAELAEFE HDIALFESELQQYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	3,1
529	MGSWHWFKEDLAMITDVLEALGGSEAELAAF ESEIAVFEADLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	5,2
530	MGSWSWFQWDLAGIKDHLEALGGSEAELAEF ESEIAYFEDELQWYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CD123	12,9
531	MGSWTEFKGELAEIKWILEALGGSEAELAFFED EIAAFEWDLQKYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD123	8,2
532	MGSWFEFKWTALIKQELEALGGSEAELADFE	CD123	4,9

	QEIAEFEWLQTYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN		
533	MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFM DEIMAFEWELWAYKGGKNPEVEALMNEAFAI DVELYAYRHN	CD123	3,4
534	MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFE WEIVAFFSELFAYKGGKNPEVEALRDEAIAIETE LVAYRHN	CD123	3,6
535	MGSWWEFDHRLTAIDTRLQALGGSEAELAEFE SSIAEFEWLQDYKGGKNPEVEALFAEAEAIY VELDAYRHN	CD123	4,3
536	MGSWWEFQFRLYAIDQRLALGGSEAELAEFE QDIADFEWMLQDYKGGKNPEVEALMLEADAIE AELKAYRHN	CD123	3,1
537	MGSWYEFDHRLDAIYQRLWALGGSEAELAEFE YGIAEFEEYLQDYKGGKNPEVEALISEAWAIEW ELSAYRHN	CD123	4,6
538	MGSWYEFDMRLDAIWERLTALGGSEAELADFE QYIAEFERQLQDYKGGKNPEVEALFDEAWAIE DELYAYRHN	CD123	13,7
539	MGSWSEFDSRLDAIAYRLFALGGSEAELAQFE WIIADFEEDLQMYKGGKNPEVEALFSEAYAIEI ELNAYRHN	CD123	4,3
540	MGSWYEFDDRLDAIAYRLNALGGSEAELAWFE WEIAEFELDLQWYKGGKNPEVEALVWEADAIE WELEAYRHN	CD123	4,6
541	MGSWFEFDERLDAIGSRLTALGGSEAELASFEF YIADFEEWLQQYKGGKNPEVEALEWEAFAIDE ELGAYRHN	CD123	3,8
542	MGSWEEFDQRLDAIDVRLYALGGSEAELAEFE FDIAAFEWLQLYKGGKNPEVEALNMEAFAIT DELCAYRHN	CD123	3,6
543	MGSWEEFDVRLDAIFNRLWALGGSEAELAEFE FDIAWFEMDLQEYKGGKNPEVEALFDEAEAIT	CD123	4,7

	NELVAYRHN		
544	MGSWEEFDKRLDAITRRLMALGGSEAELAEFE STIAWFEWDLQEYKGGKGNPEVEALDWEAY AID YELGAYRHN	CD123	4,5
545	MGSWYEFDHRLEAIYDRLWALGGSEAELAFFE FDIADFEWDLQSYKGGKGNPEVEALFDEAAAIG HELLAYRHN	CD123	4,5
546	MGSWNEFDDRLLAIWGRDLALGGSEAELAFFE EQIAGFEDELQWYKGGKGNPEVEALDQEAEAIE KELWAYRHN	CD123	4,1
547	MGSWVEFDDRLDAIWERLDALGGSEAELAWF EEQIAVFEHQLQDYKGGKGNPEVEALNQEAEAI DLELKAYRHN	CD123	5
548	MGSWTEFDDRLFAIYWRLDALGGSEAELAWFE EVIAEFENDLQVYKGGKGNPEVEALDDEAHAISI ELEAYRHN	CD123	6,4
549	MGSWSEFDQRLEAIWNRLDALGGSEAELADFE REIAYFENQLQWYKGGKGNPEVEALNNEAFAIV DELGAYRHN	CD123	3,4
550	MGSWYEFDERLWAIWERLDALGGSEAELAHFE WVIADFENDLQWYKGGKGNPEVEALEFEAEAIV TELHAYRHN	CD123	3,6
551	MGSWMEFDYRLEAIWMRLIALGGSEAELADFE SSIADFEHHLQSYKGGKGNPEVEALEWEAFAIGV ELDAYRHN	CD123	3,1
552	MGSWYEFESRLEAIWWRLEALGGSEAELAQFE QYIADFEQHLQWYKGGKGNPEVEALDWEADAI WLELQAYRHN	CD123	4,4
553	MGSWEEFYMRLVAIHMRLRALGGSEAELAVFE NYIAEFEEYLQYYKGGKGNPEVEALTIEADAIGT ELGAYRHN	CD123	4,4
554	MGSWDEFY YRLVAITHRLHALGGSEAELAWFE DDIAGFEWDLQTYKGGKGNPEVEALYKEAGAIG MELTAYRHN	CD123	5,4

555	MGSWEEFDTRLLAIFGRLGALGGSEAEALALFE MLIAKFEDDLQNYKKGKGNPEVEALSEEAFIDH ELGAYRHN	CD123	6,7
556	MGSWREFDQRLWAIDWRLEALGGSEAEALAMF EWMIAFEDDLQWYKKGKGNPEVEALYREAFAI DWELDAYRHN	CD123	3,4
557	MGSWEEFHERLDAIDERLEALGGSEAEALAFFED DIASFEDWLQWYKKGKGNPEVEALSREADAINF ELEAYRHN	CD123	4,3
558	MGSWNEFYERLEAIDRRLFALGGSEAEALALFE WMIADFEDDLQMYKKGKGNPEVEALINEAGAIG FELEAYRHN	CD123	5,2
559	MGSWTEFTQRLEAIVDRLFALGGSEAEALAEFEN SIADFEWDLQWYKKGKGNPEVEALNREAVAIDN ELWAYRHN	CD123	3,9
560	MGSWVEFIMRLDAIYERLDALGGSEAEALAEFE WHIADFEDHLQWYKKGKGNPEVEALFEEADAI WEELWAYRHN	CD123	6,4
561	MGSWNEFLLRLDAIEHRLFALGGSEAEALAEFE WEIADFEDDLQWYKKGKGNPEVEALVEEAEAID VELVAYRHN	CD123	3,2
562	MGSWYEFNMRLGAIDDRQLQALGGSEAEALAWF EDMIAIFEDDLQIYKKGKGNPEVEALEQEAAAIH QELWAYRHN	CD123	3,8
563	MGSWEEFHWRLGAIDARLEALGGSEAEALAWFE DGIADFEAILQDYKKGKGNPEVEALDSEAVAIHH ELWAYRHN	CD123	3,3
564	MGSWYEFYERLWAIDDRLWALGGSEAEALAEFE DSIATFEPQLQMYKKGKGNPEVEALVAEAWAIFD ELAAAYRHN	CD123	3,6
565	MGSWFEFDQRLDAITFRLWALGGSEAEALAEFE DVIALFEYHLQDYKKGKGNPEVEALEVEAWAIF HELGAYRHN	CD123	3,2
566	MGSWSEFWFRLDAIEDRLWALGGSEAEALAEFE	CD123	4,5

	DNIALFEYSLQHYKGGKGNPEVEALVKEANAID DELGAYRHN		
567	MGSWYEFWDRLTAIEHRLWALGGSEAELAYFE DSIAHFEGSLQVYKGGKGNPEVEALYKEAEAIE WELEAYRHN	CD123	4,4
568	MGSWYEFDDRLWAIFDRLFALGGSEAELAFFE DSIAEFEEELQHYKGGKGNPEVEALYLEAWAIEN ELGAYRHN	CD123	4,7
569	MGSWNEFVERLSAIDHRLWALGGSEAELADFE QQIAEFEIHLQEYKGGKGNPEVEALDFEADAIFD ELLAYRHN	CD123	3,2
570	MGSWSEFVDRLDAIFDRLWALGGSEAELAWFE DTIAHFENLQEQYKGGKGNPEVEALNGEADAIT DELHAYRHN	CD123	5,3
571	MGSWAEFDSRLDAIAQRLFALGGSEAELAHFE DFIAQFEYSLQEYKGGKGNPEVEALSNEADAIFN ELKAYRHN	CD123	3,6
572	MGSWAEFDSRLIAIFDRLWALGGSEAELAWFE DDIAQFEQHLQAYKGGKGNPEVEALRQEADAIT FELKAYRHN	CD123	3,6
573	MGSWTEFEERLEAIWDRLYALGGSEAELAAFE WDIAYFEDGLQEYKGGKGNPEVEALFMEAEAIR ELKAYRHN	CD123	5,9
574	MGSWYEFEDRLAAIWDRLNALGGSEAELAIFE WDIAWFEEGLQEYKGGKGNPEVEALKHEASAIQ TELFAYRHN	CD123	6,4
575	MGSWLFEFESRLWAIWDRLDALGGSEAELAHFE QDIADFEMSLQEYKGGKGNPEVEALIREAEAIET ELYAYRHN	CD123	3,4
576	MGSWMEFEDRLIAIWARLDALGGSEAELAWFE ADIADFEESLQEYKGGKGNPEVEALIFEAIINKE LMAYRHN	CD123	3,7
577	MGSWFTEFTIRLEAIQDRLDALGGSEAELAWFE WDIAEFEEGLQFYKGGKGNPEVEALHTEADAIM	CD123	3,5

	NELVAYRHN		
578	MGSWYEFVSRDLAIEYRLWALGGSEAELAWFE WDIADFEQGLQFYKGGKGNPEVEALAQEANAIG SELTAYRHN	CD123	3,2
579	MGSWEEFDYRLYAIQDRLYALGGSEAELAFFE WEIADFEHMLQMYKGGKGNPEVEALFQEADAID AELHAYRHN	CD123	4,4
580	MGSWIEFFHRLDAIQDRLDALGGSEAELAYFE WAIADFEHMLQLYKGGKGNPEVEALQFEAFAIE GELYAYRHN	CD123	3,5
581	MGSWYEFSSRLNAIDDLWALGGSEAELAYFE TDIADFESLLQWYKGGKGNPEVEALLNEADAID YELYAYRHN	CD123	3,8
582	MGSWFEFYRLDAIIDRLFALGGSEAELAEFES MIANFEYSLQEYKGGKGNPEVEALYFEADAIVDE LTAYRHN	CD123	4
583	MGSWLEFEYRLDAIYDRLFALGGSEAELAAFE QDIADFEKYLQYYKGGKGNPEVEALWEEADAIM WELFAYRHN	CD123	3,1
584	MGSWHEFEERLMAIEDRLWALGGSEAELAEFE QWIALFEYDLQEYKGGKGNPEVEALGMEAFAIN NELSAYRHN	CD123	5,8
585	MGSWYEFEEERLDAIEDRLIALGGSEAELAIFEDI IAFFEQDLQYYKGGKGNPEVEALEMEAEAISIEL DAYRHN	CD123	4,1
586	MGSWHEFEKRLYAIEDRLIALGGSEAELAWFE DSIAWFEWDLQMYKGGKGNPEVEALNEEADAIY QELDAYRHN	CD123	3,6
587	MGSWIEFEDRLDAITDRLWALGGSEAELAEFEH QIAFFEEDLQWYKGGKGNPEVEALHMEAEAIME ELGAYRHN	CD123	9,5
588	MGSWMEFEDRLMAIVDRLWALGGSEAELADF EWNIAMFEEELQWYKGGKGNPEVEALGDEAEAI EWELYAYRHN	CD123	6,8

589	MGSWEEFEDRLF AID SRL WALGGSEAELAEFE NIIASFEEVLQ EYK GKGNPEVEALSVEAFAIDRE LGAYRHN	CD123	3,7
590	MGSWEEFLFRLEAIQDRL WALGGSEAELAWFE YEIASFEDVLQSYK GKGNPEVEALSTEAKAIDY ELFAYRHN	CD123	8,2
591	MGSWVEFDNRLF AIDERL WALGGSEAELAWFE EEIASFEDNLQKYK GKGNPEVEALQLEAFAIME ELDAYRHN	CD123	3,3
592	MGSWFEFDDRLEAIFDRL WALGGSEAELAMFE FAIAEFEDALQ EYK GKGNPEVEALYEEAVAIDE ELYAYRHN	CD123	4,1
593	MGSWFEFDARLMAIN DRL WALGGSEAELA AFE YHIALFEDQLQMYK GKGNPEVEALTLEAVAIN EELWAYRHN	CD123	4
594	MGSWVEFDSRLA AIDYRLEALGGSEAELAWFE YTIANFEHTLQMYK GKGNPEVEALVYEAHAIA TELQAYRHN	CD123	3,4
595	MGSWTEFDERLDAIDWRLEALGGSEAELAWFE GDIALFEQYLQVYK GKGNPEVEALMEEADAIAK AELDAYRHN	CD123	4,5
596	MGSWIEFDERLDAIDFRL WALGGSEAELAWFE GWIAEFESDLQLYK GKGNPEVEALNEEANAIFH ELSA YRHN	CD123	7
597	MGSWWEFDSRLDAIDFRL WALGGSEAELAWF EVEIADFEDWLQLYK GKGNPEVEALWHEADAI VTELYAYRHN	CD123	3,2
598	MGSWYEFDERLDAIFDRL WALGGSEAELAYFE QVIATFEKTLQRYK GKGNPEVEALDTEAKAIS WELDAYRHN	CD123	3
599	MGSWYEFQERLDAID SRL WALGGSEAELAWFE YTIAEFEKELQMYK GKGNPEVEALGTEA VAISE ELMAYRHN	CD123	5,5
600	MGSWEEFEDRLWAIDGRLYALGGSEAELAWFE	CD123	9,4

	QWIATFEEDLQDYKGGKNPEVEALEYEASAI ELEYRHN		
601	MGSWFEFGDRLEAIDERLYALGGSEAELAQFE WWIAEFEHHLQDYKGGKNPEVEALEYEADAI WGELHAYRHN	CD123	4,5
602	MGSWFEFNDRLDAISERLSALGGSEAELAYFE WQIAVFEKTLQNYKGGKNPEVEALTLEANAIFE ELEYRHN	CD123	3,9
603	MGSWVEFMDRLEAIEERLSALGGSEAELAFFE WEIAEFEEHLQVYKGGKNPEVEALEWEALAIT EELAAYRHN	CD123	4
604	MGSWIEFMDRLWAIDQRLWALGGSEAELAWF EEEIAWFEEELQVYKGGKNPEVEALEWEATAIS EELWAYRHN	CD123	6,5
605	MGSWEEFNWRLRAIDERLRFALGGSEAELAWFE YDIAEFEEQLQVYKGGKNPEVEALRVEAAIAE ELYAYRHN	CD123	5,4
606	MGSWWEFEIRLDAIDERLWALGGSEAELAWFE QSIAFFENDLQVYKGGKNPEVEALRWEANAIE ELFAYRHN	CD123	3,2
607	MGSWYEFEWRLDAIDRRLWALGGSEAELADF EEEIADFEWMLQNYKGGKNPEVEALVDEASAI QTELWAYRHN	CD123	10
608	MGSWYEFVYRLRAIDERLWALGGSEAELAMFE FEIAFFEDQLQRYKGGKNPEVEALVDEAQADF ELFAYRHN	CD123	4,5
609	MGSWWEFEDRLYAIDDRLWALGGSEAELAQF EREIAQFEIWLQEYKGGKNPEVEALDDEATAIN SELFAYRHN	CD123	5,5
610	MGSWDEFEFRLAIDSRLWALGGSEAELAVFE YEIAQFEFMLQEYKGGKNPEVEALGMEAWAIE NELFAYRHN	CD123	3,6
611	MGSWEEFEWRLDAIDERLWALGGSEAELATFE YEIAIFENELQQYKGGKNPEVEALDSEAYAIE	CD123	4,3

	ELGAYRHN		
612	MGSWYEFFDRLDAIDERLWALGGSEAELAWFE AEIAEFEMELQGYKGGKNPEVEALDVEAHAIE MELFAYRHN	CD123	3,7
613	MGSWYEFMGRLEAIDERLQALGGSEAELAWFE HEIAEFEWSLQWYKGGKNPEVEALRFEAGAIP WELWAYRHN	CD123	3,5
614	MGSWVEFSNRLDAIWERLQALGGSEAELAYFE WEIAEFEWELQSYKGGKNPEVEALNAEADAIE WELEAYRHN	CD123	5,1
615	MGSWEEFHMRLIAIDERLWALGGSEAELAGFE ESIAYFESQLQDYKGGKNPEVEALDYEAHAIW RELYAYRHN	CD123	3,9
616	MGSWWEFKYRLDAICFRLAALGGSEAELASFE DEIAYFEEDLQGYKGGKNPEVEALDYEALAIW DELAAYRHN	CD123	3,1
617	MGSWDEFAMRLEAIQARLFALGGSEAELAIFED EIAFFETMLQDYKGGKNPEVEALEYEAIAIEAE LGAYRHN	CD123	3,7
618	MGSWWEFNARLDAIEDRLMALGGSEAELAYF EDIASFENILQQYKGGKNPEVEALWYEAYAIE KELNAYRHN	CD123	3,4
619	MGSWIEFWNRLEAIEERLYALGGSEAELAYFED EIAEFEIYLQYKGGKNPEVEALKHEAEAINKE LMAYRHN	CD123	5,2
620	MGSWNEFVIRLFAIDDRLYALGGSEAELAWFE DEIATFEYELQRYKGGKNPEVEALEYEAIAIVS ELFAYRHN	CD123	3,5
621	MGSWYEFRLARLYAIDERLWALGGSEAELATFE HWIADFEEQLQSYKGGKNPEVEALTDEAVAIG EELSAYRHN	CD123	4,5
622	MGSWLEFETRLHAIDERLWALGGSEAELAEFE EHIAWFEEDLQFYKGGKNPEVEALDFEADAIG WELWAYRHN	CD123	4,6

623	MGSWFEFETRLEAIDLRLWALGGSEAELATFED VIAFFEDWLQFYKGGKNPEVEALKMEAWAIGE ELHAYRHN	CD123	6,6
624	MGSWHEFWQRLEAIEGRLWALGGSEAELADFE SLIADFEEQLQEYKGGKNPEVEALMAEAEAIDN ELRAYRHN	CD123	7
625	MGSWYEFEQRLEAIEWRLGALGGSEAELATFE EDIADFEEWLQEYKGGKNPEVEALQYEAYAIA EELHAYRHN	CD123	4,4
626	MGSWYEFENRFLFAIEERLWALGGSEAELAWFE YEIANFEWGLQSYKGGKNPEVEALDNEAEAIDI ELAAAYRHN	CD123	3,3
627	MGSWYEFEQRLGAIERLWALGGSEAELAAFE DIIAYFEYQLQSYKGGKNPEVEALDEEAWAIDD ELWAYRHN	CD123	10,6
628	MGSWWEFEQRLDAIETRLWALGGSEAELAYFE HIIADFEDLQIYKGGKNPEVEALGWEAFAIDG ELTAYRHN	CD123	4,7
629	MGSWFEPYRLEAIEERLYALGGSEAELAQFEQ FIAWFEMDLQDYKGGKNPEVEALWFEANAIVE ELDAYRHN	CD123	3,1
630	MGSWVEFYDRLEAIEIRLWALGGSEAELADFES FIAHFEDDLQAYKGGKNPEVEALMDEANAIVF ELDAYRHN	CD123	4
631	MGSWVEFWDRDLAIEERLWALGGSEAELAEFE FMIAMFEQHLQEYKGGKNPEVEALIPEAGAIK ELTAYRHN	CD123	10
632	MGSWDEFDARLWAIEERLWALGGSEAELAEFE FMIAAFEDVLQEYKGGKNPEVEALMGEANAIV MELDAYRHN	CD123	4,3
633	MGSWYEFWRRLDAIEERLWALGGSEAELAMF ETDIAGFEWMLQLYKGGKNPEVEALEHEAWAI NSELDAYRHN	CD123	3,6
634	MGSWHEFIWRLDAIEERLWALGGSEAELAWFE	CD123	3,3

	TEIATFEAQLQDYKKGKNPEVEALEWEAIAIAW ELDAYRHN		
635	MGSWYEFYWRLEAIEERLWALGGSEAELAEFE KAIATFEDQLQTYKKGKNPEVEALETEALAIHA ELEAYRHN	CD123	3,7
636	MGSWFEFQWRLEAIEDRLWALGGSEAELAEFE TIIAGFEEQLQVYKKGKNPEVEALEEEAMAIQT ELHAYRHN	CD123	3,4
637	MGSWWEFEDRLWAIEQRDLALGGSEAELAVFE NSIAKFEDMLQVYKKGKNPEVEALHEEADAI WELYAYRHN	CD123	4,4
638	MGSWWEFEDRLWAIDRRLMALGGSEAELAVF EQMIAHFEQILQVYKKGKNPEVEALHFEAHAIG MELAYRHN	CD123	4,6
639	MGSWWEFLDRLEAIEYRLQALGGSEAELAVFE WEIAMFEDHLQGYKKGKNPEVEALHSEAHAIIS ELSAYRHN	CD123	3,1
640	MGSWAEFEDRLAAIERRLEALGGSEAELADFES SIAWFEPDLQYYKKGKNPEVEALMYEAEAFSE LYAYRHN	CD123	4,2
641	MGSWWEFYDRLTAIEARLWALGGSEAELADFE EGIADFEYDLQDYKKGKNPEVEALFWEAWAIQ SELTAYRHN	CD123	3,2
642	MGSWYEFEDRLAAIEARLWALGGSEAELADFE EEIAYFEHGLQWYKKGKNPEVEALESEAMAID ELHAYRHN	CD123	3,8
643	MGSWWEFSWRLEAIETRLDALGGSEAELAFFE MDIAWFEQDLQLYKKGKNPEVEALEEEAYAIY EELEAYRHN	CD123	3,3
644	MGSWEEFFRLEAIDDRLYALGGSEAELALFEE VIA YFEQDLQWYKKGKNPEVEALYVEAYAIQE ELYAYRHN	CD123	3,2
645	MGSWFEFEERLNAISWRLHALGGSEAELAYFE EDIAWFEDDLQFYKKGKNPEVEALENEAYAIW	CD123	13

	EELDAYRHN		
646	MGSWFEEFERLEAIIYRLWALGGSEAEAMFEE SIAWFESDLQYKKGKNPEVEALEYEAMAIK ELKAYRHN	CD123	3,7
647	MGSWAEFDDRLEAIEYRLHALGGSEAEAWFE EGIAGFEHALQSYKKGKNPEVEALETEAGAIN ELWAYRHN	CD123	5,8
648	MGSWDEFEEERLQAIEYRLWALGGSEAEAWFE EVIAQFEYDLQYKKGKNPEVEALSTEAQAIQD ELWAYRHN	CD123	3,8
649	MGSWWEFTDRLDAIFDRLWALGGSEAEAAFE ESIAIFEQDLQYYKKGKNPEVEALEYEANAIQY ELEAYRHN	CD123	7,5
650	MGSWWEFTDRLEAIEDRLWALGGSEAEALAHFE DSIAQFEQELQWYKKGKNPEVEALADEADAIE SELHAYRHN	CD123	16,6
651	MGSWVEFFWRLDAIEDRLWALGGSEAEALANFE FEIADFEAWLQYKKGKNPEVEALHSEADAIQ LELRAYRHN	CD123	4
652	MGSWVEFYNRLDAIENRLWALGGSEAEALAFFE ELIAQFEFALQDYKKGKNPEVEALEDEADAIWE ELMAYRHN	CD123	6,9
653	MGSWEEFYRLHAIDNRLWALGGSEAEALAYFE WHIADFELELQDYKKGKNPEVEALSEEATAIFE ELWAYRHN	CD123	3
654	MGSWREFHDRLF AIDGRLWALGGSEAEALANFE WDIADFEFELQDYKKGKNPEVEALSWEADAIM QELGAYRHN	CD123	5,6
655	MGSWEEFDERLWAISDRLWALGGSEAEALAYFE GEIAYFEQNLQTYKKGKNPEVEALQTEALAIT ELWAYRHN	CD123	6,5
656	MGSWEEFEQRLWAIDDRWLALGGSEAEALAFFE YEIAEFEMDLQWYKKGKNPEVEALFYEAHAIN EELWAYRHN	CD123	5,7

657	MGSWDEFHQRLAAIGDRLWALGGSEAELAYFE WEIATFEWDLQVYKKGKNPEVEALYFEATAID EELMAYRHN	CD123	3,7
658	MGSWVEFEYRLDAISDRLWALGGSEAELAFFE NEIASFESDLQFYKKGKNPEVEALMFEAEAIDD ELHAYRHN	CD123	6,5
659	MGSWDEFDTRLDAIFSRLYALGGSEAELAMFE GEIAEFEGSLQHYKKGKNPEVEALDFEAHAIDE ELWAYRHN	CD123	4
660	MGSWHEFDRLDAIMSRLDALGGSEAELATFE AEIATFEFVLQLYKKGKNPEVEALLAEAYAIWD ELEAYRHN	CD123	7,7
661	MGSWYEFFDRLDAIYDRLYALGGSEAELASFE AQIAEFEVELQSYKKGKNPEVEALEWEAWAID EELYAYRHN	CD123	4,7
662	MGSWFEFLYRLDAIEDRLWALGGSEAELAEFE QEIAKFESELQSYKKGKNPEVEALEWEAHAID MELEAYRHN	CD123	6,6
663	MGSWLEFEDRLVAIDHRLFALGGSEAELAEFEE EIALFESYLQDYKKGKNPEVEALNWEADAIHA ELYAYRHN	CD123	3,9
664	MGSWYEFESRLDAIVDRLWALGGSEAELAEFE YEIAKFEWELQDYKKGKNPEVEALNWEAGAIE FELYAYRHN	CD123	5,1
665	MGSWYEFEDRLDAILYRLLALGGSEAELAWFE RDIAFFESELQWYKKGKNPEVEALEWEAMAID DELFA YRHN	CD123	4,3
666	MGSWGEFMDRLEAIDYRLWALGGSEAELAWF ESDIAEFEQELQMYKKGKNPEVEALWDEAMAI RDELFA YRHN	CD123	4,6
667	MGSWEEFDDRLDAIEHRLWALGGSEAELADFE GSIAAFESWLQVYKKGKNPEVEALEAEAEAIA DELWAYRHN	CD123	4
668	MGSWYEFADRLDAIMDRLVALGGSEAELAYFE	CD123	3,3

	WEIAAFEFLQMYKGKGNPEVEALDEEAIAIK DELMAYRHN		
669	MGSWNEFWERLDAIEWRLFALGGSEAELAFFE LDIAWFEEELQWYKGKGNPEVEALIFEAHAIL ELDAYRHN	CD123	3
670	MGSWYEFDARLDAIEERLYALGGSEAELAAFE FEIAGFEEALQWYKGKGNPEVEALLKEAEAID ELYAYRHN	CD123	8,9
671	MGSWDEFSERLDAIWGRLEALGGSEAELATFE FHIAEFEHELQYYKGKGNPEVEALQGEAAIIN ELYAYRHN	CD123	3,2
672	MGSWDEFWDRLDAIEDRLFALGGSEAELADFE RVIAWFENDLQEYKGKGNPEVEALDNEADAI ELHAYRHN	CD123	3,9
673	MGSWDEFDDRLEAIVDRRLFALGGSEAELAMFE FEIAQFEHQLQYYKGKGNPEVEALRDEADAI ELDAYRHN	CD123	5,6
674	MGSWEEFTIRLGAIYWRLFALGGSEAELANFE WFIAEFEYELQPYKGKGNPEVEALVIEANAID ELQAYRHN	CD123	3,3
675	MGSWFEFWRLDAIENRLNALGGSEAELAWFE YHIAAFEDSLQHYKGKGNPEVEALEWEAHAI SELQAYRHN	CD123	3,3
676	MGSWYEFDDRLEAIWDRLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEWLRETAADIR ELQAYRHN	CD123	3,3
677	MGSWGEFWARLEAIWIRLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEWLREEAADIR SLQAYRHN	CD123	15
678	MGSWIEFEVRLDAIWDRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEYLRDEAADIR SLQAYRHN	CD123	4,2
679	MGSWTEFDRRLDAIWDRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEWLREEAADIR D	CD123	9,2

	YLQAYRHN		
680	MGSWTEFDMRLDAIWDRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELREEAATIRG VLQAYRHN	CD123	3,1
681	MGSWEEFHDRLMAIETRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRYEAADIR DYLQAYRHN	CD123	4,3
682	MGSWVEFRDRLDAIETRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRYEAAEIR MVLQAYRHN	CD123	4,2
683	MGSWMEFIDRLDAIEHRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLREEAAEIRM YLQAYRHN	CD123	4,3
684	MGSWTEFVWRLDAIEWRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLREEAAEIRD WLQAYRHN	CD123	4,2
685	MGSWVEFYDRLYAIEVRLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRQEAAEIRD WLQAYRHN	CD123	5,8
686	MGSWYEFYDRLDAIEWRLWALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWL RDEAAQIR DFLQAYRHN	CD123	6,2
687	MGSWVEFYDRLDAIEHRLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWL RDEAAFIRD MLQAYRHN	CD123	3,4
688	MGSWFEFVDRLTAIQVRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLREEAALIRY SLQAYRHN	CD123	5,1
689	MGSWFEFLDRLDAIEERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLREEAAVIRD SLQAYRHN	CD123	12,2
690	MGSWYEFMVRLDAIEERLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLREEAASIRY HLQAYRHN	CD123	4,1

691	MGSWYEFEDRLDAIQWRLWALGGSEAELA AF EKEIAAFESESELQAYKGGKGNPEVEFLRESAANIR QHLQAYRHN	CD123	6,3
692	MGSWSEFEYRLFAIENRLDALGGSEAELA AFEK EIAAFESESELQAYKGGKGNPEVEFLREEAAMIRQL LQAYRHN	CD123	3,2
693	MGSWVEFEYRLDAITERLLALGGSEAELA AFE KEIAAFESESELQAYKGGKGNPEVEILREEAAFIRQ WLQAYRHN	CD123	3,9
694	MGSWWEFLDRLDAIEMRLFALGGSEAELA AFE KEIAAFESESELQAYKGGKGNPEVEYLREEAALIRN MLQAYRHN	CD123	9
695	MGSWWEFEDRLDAIEYRLFALGGSEAELA AFE KEIAAFESESELQAYKGGKGNPEVEFLREEAAFIRIF LQAYRHN	CD123	4,9
696	MGSWWEFESRLDAIFMRLTALGGSEAELA AFE KEIAAFESESELQAYKGGKGNPEVEDLREDAAFIRE FLQAYRHN	CD123	3,7
697	MGSWVEFWHRLDAIKARLNALGGSEAELA AFE KEIAAFESESELQAYKGGKGNPEVEDLRWYAADFR LILQAYRHN	CD123	3,5
698	MGSWYEFYNRLSAIYARLQALGGSEAELA AFE KEIAAFESESELQAYKGGKGNPEVEDLRWYAADIR YMLQAYRHN	CD123	10,6
699	MGSWYEFYDRLSAIYARLQALGGSEAELA AFE KEIAAFESESELQAYKGGKGNPEVEDLRWYAADIR YMLQAYRHN	CD123	5,3
700	MGSWNEFYDRLSAIYFRLQALGGSEAELA AFE KEIAAFESESELQAYKGGKGNPEVEHLRWYAADIR MILQAYRHN	CD123	10,6
701	MGSWNEFYDRLSAIYFRLQALGGFEAELA AFE KEIAAFESESELQAYKGGKGNPEVEHLRWYAADIR MILQAYRHN	CD123	9
702	MGSWEEFYDRLGAIFARLHALGGSEAELA AFE	CD123	3,9

	KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRWYAADIR MILQAYRHN		
703	MGSWVEFYDRLHAIYFRLLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRWYAADIR LVLQAYRHN	CD123	4,8
704	MGSWKEFDNRLYAIEDRLRALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEHLRWYAADIR MILQAYRHN	CD123	3,9
705	MGSWVEFWDRWLWAIEDRLWALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEHLRHYAADIR VWLQAYRHN	CD123	4,5
706	MGSWYEFADRLWAIEDRLWALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRYAADIR WVLQAYRHN	CD123	4
707	MGSWYEFEEERLYAIEDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRQEAADIRL MLQAYRHN	CD123	11,5
708	MGSWTEFEWRLYAIEDRLMALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRDEAADIRQ YLQAYRHN	CD123	4,2
709	MGSWIEFESRLWAIEDRLLALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRLEAADIRE LQAYRHN	CD123	8,7
710	MGSWFEFEDRLDAIWDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRMDAAMIR YILQAYRHN	CD123	5,1
711	MGSWEEFEDRLWAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEILRYDAAYIREI LQAYRHN	CD123	4,1
712	MGSWIEFEDRLYAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRYEAAEIRY WLQAYRHN	CD123	4
713	MGSWYEFWDRLEAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRYSAAEIRY	CD123	4,2

	QLQAYRHN		
714	MGSWVEFESRLAAIEHRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELREYAAEIRD WLQAYRHN	CD123	3,7
715	MGSWWEFEHRLFAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRDYAAEIRD YLQAYRHN	CD123	7,6
716	MGSWYEFDSRLMAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRQEAAEIRM ILQAYRHN	CD123	3,2
717	MGSWYEFEWRLMAIEDRLWALGGSEAELAAFE EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRHEAAEIR DVLQAYRHN	CD123	3,4
718	MGSWYEFYNRLDAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRQEAADIRG QLQAYRHN	CD123	11,3
719	MGSWWEFHDRLEAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRIEAADIRR QLQAYRHN	CD123	6,4
720	MGSWYEFWDRLEAIEERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRLEAADIRR ILQAYRHN	CD123	4,6
721	MGSWYEFEEERLWAIEERLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRYEAAWIR DFLQAYRHN	CD123	5,4
722	MGSWYEFENRLEAIEERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEMLREEAAFIRD WLQAYRHN	CD123	6,1
723	MGSWYEFEYRLEAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRREEAAWIRV WLQAYRHN	CD123	6,2
724	MGSWYEFENRLGAIGDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRDEAA YIR AVLQAYRHN	CD123	4,8

725	MGSWYEFEHRLDAIYDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLREEAAWIR LWLQAYRHN	CD123	6,3
726	MGSWYEFEWRLDAIYDRLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLREDAAEIRA LLQAYRHN	CD123	6
727	MGSWVEFENRLEAIENRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLREDAAQIR MMLQAYRHN	CD123	6,2
728	MGSWYEFEEERLEAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLREQAAFIRT MLQAYRHN	CD123	6
729	MGSWFEFWRLEAIFDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRAEAAEIRL RLQAYRHN	CD123	6,9
730	MGSWWEFEDRLMAIYDRLYALGGSEAELAAFE EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRAEAAALIR ETLQAYRHN	CD123	15,3
731	MGSWFEFEDRLYAIEDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRWGAATIR DELQAYRHN	CD123	4,7
732	MGSWIEFWDRLEAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRDEAAWIRD SLQAYRHN	CD123	4,5
733	MGSWFEFWDRDLDAIEDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRDEAAWIRG TLQAYRHN	CD123	4,9
734	MGSWEEFTDRLWAIEDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRDEAAFIRK SLQAYRHN	CD123	8,9
735	MGSWVEFVDRLEAIEDRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRDQAAAYIRF MLQAYRHN	CD123	4,9
736	MGSWFEFVDRLEAIEMRLFALGGSEAELAAFE	CD123	7,1

	KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVELLRWRAAMIR YDLQAYRHN		
737	MGSWWEFEMRLEAIEDRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRWEAAFIRD ILQAYRHN	CD123	4
738	MGSWFEFERLEAIEDRLFALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEFLRDEAAEIRQV LQAYRHN	CD123	3
739	MGSWYEFYQRLEAIEDRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRDEAAEIRV VLQAYRHN	CD123	3
740	MGSWIEFEDRLEAIEDRLFALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRQEAAEIRL MLQAYRHN	CD123	21,8
741	MGSWHEFYDRLDAIYFRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVELLRLLAAEIRK ELQAYRHN	p26	9,6
742	MGSWHEFITRLEAIDQRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRFWAAEIRF ILQAYRHN	p26	16,91
743	MGSWMEFFDRLVAIDERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRMWAAEIR FLLQAYRHN	p26	18,62
744	MGSWVEFSGRLIAIDNRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRMWAAEIR YILQAYRHN	p26	5,28
745	MGSWVEFHRLFAIDERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRMVAAEIR YILQAYRHN	p26	21,39
746	MGSWHEFMERLIAIDGRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRVAAFIRD VLQAYRHN	p26	17,85
747	MGSWKEFIQRDLAIHYRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRVAAFIRF	p26	18,41

	ELQAYRHN		
748	MGSWSEFIFRLDAIHSRLQALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRFIAAEIRLKL QAYRHN	p26	28,3
749	MGSWFEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLRVHAAAIRE WLQAYRHN	p26	5,92
750	MGSWLEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLRVHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
751	MGSWFEFYHRLNAIDARLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLRVHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
752	MGSWFEFYDRLNAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLRVHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
753	MGSWFEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRVHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
754	MGSWFEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLRDHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
755	MGSWFEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLREHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
756	MGSWFEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLRVHAAHIRE WLQAYRHN	p26	
757	MGSWLEFYHRLNAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLRVHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
758	MGSWLEFYHRLNAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRDHAAHIRE WLQAYRHN	p26	19,23

759	MGSWFEFYHRLNAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRDHA AHIRE WLQAYRHN	p26	
760	MGSWLEFYDRLNAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRDHA AHIRE WLQAYRHN	p26	
761	MGSWLEFYHRLNAIDARLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRDHA AHIRE WLQAYRHN	p26	
762	MGSWLEFYHRLNAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVENLRDHA AHIRE WLQAYRHN	p26	
763	MGSWLEFYHRLNAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRVHA AHIRE WLQAYRHN	p26	
764	MGSWLEFYHRLNAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRDHA AAIRE WLQAYRHN	p26	
765	MGSWFEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRDHA AHIRE WLQAYRHN	p26	
766	MGSWFEFYERLNAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLRAHA ASIRT WLQAYRHN	p26	27,1
767	MGSWIEFYWRLEAIDQRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEDLRVHA AAIR WWLQAYRHN	p26	9,4
768	MGSWSEFVKRLDAIDQRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRVHA AAIRA WLQAYRHN	p26	27
769	MGSWEEFYRLEAIDARLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEELRVHA AHIRD WLQAYRHN	p26	30,3
770	MGSWVEFHRYRLQAIDARLWALGGSEAELAAFE	p26	14,8

	KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRVHAAHIRK WLQAYRHN		
771	MGSWVEFVGRRLNAIDARLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRHHAAEIRN WLQAYRHN	p26	26
772	MGSWNEFMDRLNAIDNRLWALGGSEAELAAFE EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLRKQAASIR LWLQAYRHN	p26	10
773	MGSWNEFFQRLNAIDERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRQHAANIR WWLQAYRHN	p26	28,7
774	MGSWYEFVVRLLFAIDERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLREHAAHIRS WLQAYRHN	p26	18,25
775	MGSWYEFYLRLLDAIDHRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEMLREHAAHIR KWLQAYRHN	p26	16
776	MGSWYEFRRARLLAIDERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEHLREHAAHIRN FLQAYRHN	p26	20,9
777	MGSWTEFWHRLEAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLREHAAHIRV WLQAYRHN	p26	13,19
778	MGSWTEFQNRRLNAIDHRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLREHAAKIRV WLQAYRHN	p26	30,5
779	MGSWSEFFKRLEAIDRRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELREHAAHIRV WLQAYRHN	p26	30,2
780	MGSWYEFQQRLEAIDTRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELREHAAHIRH WLQAYRHN	p26	27,3
781	MGSWTEFEKRLHAIDYRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLREHAAAIRH	p26	17,1

	WLQAYRHN		
782	MGSWTEFHQRLDAIDERLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEFLREHAAKIRM WLQAYRHN	p26	24,4
783	MGSWLEFSQRLTAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVENLREHAAKIRN WLQAYRHN	p26	30,4
784	MGSWTEFVNRLYAIDSRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEGLRTHAAKIRH WLQAYRHN	p26	16,7
785	MGSWMEFVDRLSAIDRRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEVLREHAAANIRQ WLQAYRHN	p26	32,1
786	MGSWVEFVSRLYAIDFRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEALREHAAQIRD WLQAYRHN	p26	29
787	MGSWSEFHTRLDAIDTRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEDLRRHAAAIRF WLQAYRHN	p26	23,5
788	MGSWLEFHSRLDAIDTRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEKLRHAAAIRH YLQAYRHN	p26	30,8
789	MGSWTEFYQRLDAIDTRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEGLRQQAQIRA WLQAYRHN	p26	29,7
790	MGSWAEFSDRLNAIDQRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEILREHAAEIRKF LQAYRHN	p26	25,3
791	MGSWMEFNHRLQAIDGRLWALGGSEAELA AF EKEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEMLREHAAAIR AFLQAYRHN	p26	33,4
792	MGSWYEFYKRLEAIDNRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEYLRHAAAIRH WLQAYRHN	p26	30,8

793	MGSWYEFYRLEAIDNRLIALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLREHAAKIREW LQAYRHN	p26	29,6
794	MGSWYEFVSRLEAIDDRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEMLRQHAAAIR HWLQAYRHN	p26	33,1
795	MGSWYEFSHRLEAIEDRLFALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEPLREHAAAYIRHW LQAYRHN	p26	26
796	MGSWFEFFERLAAIEDRLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRVHAAAIRA FLQAYRHN	p26	20,3
797	MGSWIEFKYRLDAIEWRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRIHAAAIRT WLQAYRHN	p26	18,3
798	MGSWYEFMYRLDAIEYRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRIHAAMIRE WLQAYRHN	p26	19,4
799	MGSWVEFVTRLEAIEDRLFALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEHLRAHAAHIRH WLQAYRHN	p26	11,7
800	MGSWYEFVIRLDAIEDRLFALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEHLRVHAAHIRV WLQAYRHN	p26	30,1
801	MGSWVEFVERLDAIEFRLFALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRNHAHIRS WLQAYRHN	p26	23,8
802	MGSWSEFVHRLDAIEVRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRYHAAKIRS WLQAYRHN	p26	16,9
803	MGSWSEFYRLAAIESRLFALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVERLREHAAHIRRW LQAYRHN	p26	30,8
804	MGSWYEFYLRLSAIEDRLFALGGSEAELAAFEK	p26	27,4

	EIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRVQAAHIRTW LQAYRHN		
805	MGSWYEFYDRLDAIEDRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRDQAAAYIRT WLQAYRHN	p26	31,9
806	MGSWHEFWVRLEAIESRLFALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRVQAAHIRS WLQAYRHN	p26	26,9
807	MGSWVEFYHRLEAIEQRLMALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLREQAAAIRS WLQAYRHN	p26	28,5
808	MGSWVEFYERLNAIEYRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLREHAAAYIRQ WLQAYRHN	p26	28,7
809	MGSWVEFYHRLDAIFDRLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEELRANAAGIRS WLQAYRHN	p26	20
810	MGSWSEFTDRLF AIEDRLALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGKGNPEVEDLRMHAASIRL WLQAYRHN	p26	25,4
811	MGSWHEFYDRLYAIWDRLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEGLRNAAAVIRI FLQAYRHN	p26	22,91
812	MGSWFEFSNRLYAIWHRLTALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRTQAAFIRIL LQAYRHN	p26	15,25
813	MGSWFEFSDRLYAIWERLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRFQAAFIRY QLQAYRHN	p26	18,99
814	MGSWFEFEDRLF AIWTRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVESLRQSAASIRW LLQAYRHN	p26	10,89
815	MGSWHEFSERLFAIWTRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGKGNPEVEALRQSAAFIRV	p26	8,21

	MLQAYRHN		
816	MGSWGEFTVRLYAIDRRLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKNPEVEELRRFAAIRAF LQAYRHN	p26	8,54
817	MGSWYEFDHRLMAISFRLVALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKNPEVETLRRRAANIRH LLQAYRHN	p26	20,1
818	MGSWSIFKYHLADIKLLLEALGGSEAELAYFEF LIADFEFTLQDYKKGKNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	p26	20,21
819	MGSWHHFKEYFLADIKSILEALGGSEAELAIFEV QIAYFEDLLQSYKKGKNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	p26	8
820	MGSWLYFKYNLAVIKHWLEALGGSEAELAIFE MSIADFEYELQWYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	13,3
821	MGSWFYFKYELAWIKHWLEALGGSEAELASFE THIAFFEHLQYYKKGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	13,7
822	MGSWADFKWTLAYIKHRLEALGGSEAELAFFE MEIAYFEQSLQNYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	31,5
823	MGSWAYFKGQLAYIKSGLEALGGSEAELAYFE LRIAYFEHWLQNYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	11,4
824	MGSWENFKDTLAWIKEYLEALGGSEAELAGFE HRIAIFEHYLQYYKKGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	19,2
825	MGSWVLFKDYLADIKHYLEALGGSEAELANFE HLIANFEGDLQTYKKGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	13,8
826	MGSWSLFBKHLANIKVYLEALGGSEAELADFE TFIAYFEKDLQEYKKGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	19,6

827	MGSWEHFKVELAGIKAYLEALGGSEAELALFE WAIADFESILQDYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN	p26	18,1
828	MGSWIYFKDELAGIKKYLEALGGSEAELAMFE VAIADFEAILQKYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN	p26	15,9
829	MGSWVLFKQELAWIKWLEALGGSEAELAAFE EQIARFEHDLQKYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	29,5
830	MGSWVLFKQELAWIKWYLEALGGSEAELAAF EWEIAAFEQRLQIYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	22,5
831	MGSWFLFKSELAWIKWRLEALGGSEAELAYFE YQIAEFEFWLQSYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	25,8
832	MGSWLLFKSELAWIKWYLEALGGSEAELAEFE WNIAEFEKNLQKYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	25,7
833	MGSWLLFKSDLAWIKWRLEALGGSEAELAEFE ESIAMFEHWLQEYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	33,3
834	MGSWLYFKSDLAWIKWRLEALGGSEAELADFE EAIAEFEQALQIYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN	p26	21,2
835	MGSWKLFKYELAWIKWRLEALGGSEAELADF EASIAQFEKYLQTYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	23,4
836	MGSWYLFKNELAWIKWRLEALGGSEAELADF EMVIAMFEDHLQEYKGGKGNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	p26	31,1
837	MGSWVYFKAHLAFIKWELEALGGSEAELANFE STIAEFEKYLQVYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR ELQAYRHN	p26	20,8
838	MGSWMYFKSHLAWIKWELEALGGSEAELAFF	p26	19,8

	EDNIAQFEYWLQLYKGGKNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN		
839	MGSWTLFKWDLAFIKWQLEALGGSEAELAWF EYEIAAFEDSLQNYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	12,1
840	MGSWILFKEDLAFIKWQLEALGGSEAELAWFE TTIANFESDLQKYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	23,3
841	MGSWYFFKSRLAYIKVYLEALGGSEAELAGFE WEIAHFEEWLQRYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	30,1
842	MGSWYIFKSELAWIKWYLEALGGSEAELANFE VEIATFETWLQGYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	29,6
843	MGSWYIFKQELASIKLSLEALGGSEAELAHFEA EIAWFEEWLQWYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	19,4
844	MGSWVRFKTELAYIKESLEALGGSEAELAMFE SEIAIFEHSLQTYKGGKNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	p26	20,5
845	MGSWYLFKTELA AIKYRLEALGGSEAELASFE YEIAWFEHILQFYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	20,1
846	MGSWYWFKYELAEIKWHLEALGGSEAELAHF EHSIAVFESQLQYKGGKNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	21,5
847	MGSWWVFKKTLAEIKWTLEALGGSEAELAYFE AEIAFFEFILQYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	18,6
848	MGSWVYFKDHLAEIKSQLEALGGSEAELALFE YDIAWFEFILQYYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	22,1
849	MGSWVYFKHRLAEIKDQLEALGGSEAELAEFE TDIAWFEWMLQYYKGGKNPEVEALRKEAAAI	p26	11,1

	RDELQAYRHN		
850	MGSWIIFKTDLARIKNYLEALGGSEAELATFER DIAWFEFMLQIYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	p26	16,7
851	MGSWMHFKQDLAEIKGYLEALGGSEAELAIFE MDIAWFEYMLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	p26	18,9
852	MGSWQIFKQDLAAIKDYLEALGGSEAELAIFEF DIAWFEHMLQWYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	17,4
853	MGSWLAFKEDLAHIKSILEALGGSEAELAEFEH DIAWFEYMLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	18,6
854	MGSWFVFKEDLAGIKFILEALGGSEAELAMFET DIAWFEYMLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	14,2
855	MGSWTHFKEDLAHIKDRLEALGGSEAELAAFE LDIAWFEFMLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	30,4
856	MGSWYYFKERLAAIKDRLEALGGSEAELAIFEA DIAWFEFMLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	31,5
857	MGSWYTFKGS LAEIKNRLEALGGSEAELAMFE SDIAWFEFMLQFYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	32,3
858	MGSWFTFKDDLAQIKNRLEALGGSEAELANFE MSIAWFEFMLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	30,8
859	MGSWVLFKQDLAMIKQRLEALGGSEAELAMF EYDIAWFEHMLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAI RDELQAYRHN	p26	29,7
860	MGSWVEFKRDLANIKQRLEALGGSEAELAQFE MQIAWFEHTLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	30,4

861	MGSWSYFKEDLANIKSSLEALGGSEAEALAWFE SSIAWFEHTLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	11,6
862	MGSWSIFKQDLADIKDSLEALGGSEAEALAMFE MDIAWFEHTLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	16,6
863	MGSWEIFKDDLASIKKVLEALGGSEAEALALFES DIAWFELMLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	27,9
864	MGSWSIFKDDLAVIKERLEALGGSEAEALAHFEQ DIAWFEHLLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	25,6
865	MGSWSVFKDDLAIKDRLEALGGSEAEALAQFE LDIAWFEYVLQFYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	30,3
866	MGSWAVFKDSLAIHKDVLEALGGSEAEALALFE MDIAWFEYVLQDYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	24,1
867	MGSWIAFKDHLAIKQRLEALGGSEAEALARFEF EIAWFEWMLQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	29,9
868	MGSWIHFKNDLAVIKDELEALGGSEAEALARFEI MIAWFEDALQWYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	17,9
869	MGSWMVFKQDLAEIKANLEALGGSEAEALADFE FAIAWFEYELQWYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	17,8
870	MGSWKNFKLELALIKSKLEALGGSEAEALAQFE ADIAFFEWSLQWYKGGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	p26	20,6
871	MGSWHSFKQDLAYIKYLLEALGGSEAEALAQFE ELIAFFEYLLQTYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	p26	25,6
872	MGSWVVFKSSLAQIKILLEALGGSEAEALAIFEV	p26	8,6

	KIAHFEQELQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN		
873	MGSWDQFKNSLASIKRVLEALGGSEAELAIFEV KIAHFEHFLQQYKGGKNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	p26	15,6
874	MGSWNNFKSSLASIKQVLEALGGSEAELAVFEL QIAHFERELQYYKGGKNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	p26	24,1
875	MGSWVEFGHRLWAIDQRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEKLRQRAAFIRF RLQAYRHN	CD137	
876	MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAFL GEIWAFFEMELAAAYKGGKNPEVEALGREAAAIR MELQAYRHN	CD137 (BB10)	
877	MGSWYEFDLRLHAIYDRLVALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEILRDNAAYIRQ MLQAYRHN	CD47	
878	MGSWHEFHDLRLQAIHERLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVESLRIAAHIRQ VLQAYRHN	CTLA4	
879	MGSWNYFKDHLAWIKNSLEALGGSEAELAHFE TAIASFERQLQEYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	DR5	
880	MGSWLWFKIFLAEIKYFLEALGGSEAELAADF EIHAFHVELFAYKGGKNPEVEVLREVAEIRW DLQAYRHN	KIR	
881	MGSWTEFQSRLDAIHSRLRALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKNPEVELLRDDAAFIRHF LQAYRHN	PDL1	
882	MGSWVVKVLDLATIKYILEALGGSEAELAEFEG EIAGFEYSLQFYKGGKNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	TIM3	
883	MGSWTIFKEWLAFIKTDLEALGGSEAELAFFEG WIASFEMELQKYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD	PD1	

	ELQAYRHN		
884	MGSWEEFELRLNAIEERLYALGGSEAELAYFEY VIADFEGLNQRKYKGGKNPEVEALYFEADAI FEE LVAYRHN	CD19	
885	MGSWVVKQRLAYIKDLLEALGGSEAELAYFE MSIAFFEEDLQVYKGGKNPEVEALRKEAAAIRD ELQAYRHN	CD22	
886	MGSWVEFYERLDAIDRRLWALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVEELRVHAASIRA WLQAYRHN	p26	
887	MGSWFEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVESLRAHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
888	MGSWSEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVESLRVHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
889	MGSWSEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVESLRAHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
890	MGSWSEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVESLKAHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
891	MGSWSEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVESLQAHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
892	MGSWSEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVESLRAHAAGIRE WLQAYRHN	p26	
893	MGSWFEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVESLREHAAHIRE WLQAYRHN	p26	
894	MGSWFEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELA AFE KEIAAFESELQAYKGGKNPEVESLREHAAAIRE WLQAYRHN	p26	

895	MGSWSEFYDRLNAIDARLWALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLREHAAAIRE WLQAYRHN	p26	
896	MGSWVEFEARLSAIYERLEALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRRHAAGIRSN LQAYRHN	CS1	
897	MGSWVEFFVRLDAIWERLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVETLRFHAAGIRQ KLQAYRHN	CS1	
898	MGSWTEFNLRLDAIYERLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEALRWHAAGIR QQLQAYRHN	CS1	
899	MGSWMEFYDRLDAIWVRLEALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRFAAGIR EQLQAYRHN	CS1	
900	MGSWHEFNGRLWAIYARLDALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVETLRRHAAGIRG ILQAYRHN	CS1	
901	MGSWYEFVQRLHAINDRLSALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRRAAGIRY TLQAYRHN	CS1	
902	MGSWAEFYQRLNAINRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEVLRRAAGIRG QLQAYRHN	CS1	
903	MGSWVEFNERLHAIYLRDLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVETLRRHAAGIR WQLQAYRHN	CS1	
904	MGSWNEFKLELAFIKDWLEALGGSEAELANFE EAIAEFEAGLQGYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CS1	
905	MGSWMEFEARLEAIWDRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVESLRFHAAGIRQ HLQAYRHN	CS1	
906	MGSWVEFEDRLNAIWWRLEALGGSEAELAAFE	CS1	

	KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEKLRRAAGIRT QLQAYRHN		
907	MGSWHHFKMHLAGIKLQLEALGGSEAELAEFE EWIADFEFEGALQDYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	CS1	
908	MGSWAEFFARLDAIWERLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVETLRFHAAGIRQ KLQAYRHN	CS1	
909	MGSWAEFFARLDAIWDRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVETLRFHAAGIRQ KLQAYRHN	CS1	
910	MGSWAEFFARLDAIWERLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVETLKFHAAGIRQ KLQAYRHN	CS1	
911	MGSWHEFRWRLFaiwQRLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRRLDAALIRV MLQAYRHN	HER2	10,02
912	MGSWAEFRWRLHAIWLKLGELGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLREDAEQIK YILQAYRHN	HER2	
913	MGSWAEFRWALHAIWLKLGELGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLREDAEQIK YILQAYRHN	HER2	
914	MGSWAEFRWRLHAIWLKLGALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRQDAAQI KYILQAYRHN	HER2	
915	MGSWAEFRWRLHAIWLQLGALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRQDAAQI KYILQAYRHN	HER2	
916	MGSWAEFRWRLHAIWLRLGALGGTEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRQDAAQI KYILQAYRHN	HER2	
917	MGSWAEFRWRLHAIWLRLGALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRQDAAQI	HER2	

	KYILQAYRHN		
918	MGSWAEFRWKLEAIWLRLGALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRQDAAQIK YILQAYRHN	HER2	
919	MGSWAEFRWKLGAIWRLGALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRQDAAQI KYILQAYRHN	HER2	
920	MGSWYEFRWRLHAIWLRLGALGGSEAELAAF EKEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEWLRQDAAQI RYILQAYRHN	HER2	7,18
921	MGSWHEFLRLLAIEMRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEHLRVRAASIRQ MLQAYRHN	HER2	8,15
922	MGSWWGFKVNLAWIKWKLEALGGSEAELEYF ELWIANFEHSLQEYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	HER2	8,69
923	MGSWVNFKTHLARIKVHLEALGGSEAEALAFE HDIANFEQVLQQYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	HER2	7,91
924	MGSWL VFKDELAGIKNYLEALGGSEAE LATFE QDIAWFEQWLQNYKKGKGNPEVEALRKEAAAIR DELQAYRHN	HER2	3,28
925	MGSWKTFKIELAGIKLELEALGGSEAE LAGFEN AIAQFESSLQYYKKGKGNPEVEALRKEAAAIRDE LQAYRHN	HER2	4,95
926	MGSWWEFKVRLSAIQYRLYALGGSEAE LAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEALREQAALIRTI LQAYRHN	HER2	5,17
927	MGSWWEFHIRLHAINYRLAALGGSEAE LAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEALRELA AKIRG DLQAYRHN	HER2	11,90
928	MGSWWEFQVRLRAIQYRLNALGGSEAE LAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRGLAAQIRF DLQAYRHN	HER2	14,39

929	MGSWWEFKIRLYAIEYRLNALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEALRAKAAQIRY NLQAYRHN	HER2	4,49
930	MGSWFEFNIRLHAIEYRLKALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRNYAASIRKL LQAYRHN	HER2	7,86
931	MGSWFEFEIRLRAIEYRLSALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKGNPEVEKLRRELAEEIRYA LQAYRHN	HER2	7,75
932	MGSWFEFKIRLYAIQYRLSALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRNLAEEIRHS LQAYRHN	HER2	13,08
933	MGSWWEFKVRLRAIEYRLSALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRVLAASIRIH LQAYRHN	HER2	10,09
934	MGSWSEFWRLHAILYRLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVETLRDAAAEIRV ALQAYRHN	HER2	14,79
935	MGSWIEFWRLNAILYRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEALRDSAAEIRR WLQAYRHN	HER2	3,91
936	MGSWVEFWIRLNAIKYRLLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEKLRQDAADIRE LLQAYRHN	HER2	10,62
937	MGSWTEFWWRLSAIVYRLNALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEELRDMAADIRS LLQAYRHN	HER2	5,76
938	MGSWWEFYRLRLRAISYRLQALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEGLRQDAEIRK LLQAYRHN	HER2	5,10
939	MGSWWEFHVRLRAIEYRLEALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKGGKGNPEVEQLRLIAANIRH LLQAYRHN	HER2	5,48
940	MGSWWEFHVRLKAIEYRLLALGGSEAELAAFE	HER2	4,56

	KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRYIAANIRQ LLQAYRHN		
941	MGSWWFEKVRLLKAIEYRLLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRYIAANIRQ LLQAYRHN	HER2	
942	MGSWWFEQVRLAAIEYRLKALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVENLRQLAAHIRS VLQAYRHN	HER2	6,33
943	MGSWWFEQVRLSAIEYRLTALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEELRQKAARIRS LLQAYRHN	HER2	9,61
944	MGSWWFENIRLHAIYRLKALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVELLREKAAQIRA QLQAYRHN	HER2	9,75
945	MGSWWEFRVRLEAIDYRLKALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRMKAATIR AILQAYRHN	HER2	6,82
946	MGSWYEFDIRLEAIKYRLSALGGSEAELAAFEK EIAAFESELQAYKKGKGNPEVEYLRKKA AVIRSM LQAYRHN	HER2	5,35
947	MGSWWEFRIRLEAIWYRLHALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRIFAANIRSK LQAYRHN	HER2	8,04
948	MGSWWFENVRLQAIKYRLSALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRKTAHIR WQLQAYRHN	HER2	5,23
949	MGSWWFENVRLSAIRYRLLALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEDLRASAAQIRA MLQAYRHN	HER2	6,73
950	MGSWWFENMRLSAIKYRLYALGGSEAELAAFE KEIAAFESELQAYKKGKGNPEVEILRRLAADIRER LQAYRHN	HER2	3,08

[0346] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены композиции, содержащие одну или более последовательностей DD, раскрытых в Таблице 1. В других вариантах осуществления в данном изобретении предложены композиции,

содержащие один или более DD, содержащих последовательность с гомологией 60-70 %, 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 95-99 % (и перекрывающиеся диапазоны) с последовательностью, раскрытой в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления DD, имеющие такую гомологию, являются функционально подобными или идентичными по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен полипептид, который содержит один или более DD, которые конкурируют (полностью или частично) с одной или более последовательностями DD, раскрытыми в Таблице 1 (эталонная последовательность), за его соответствующую мишень. Способность одного полипептида конкурировать с эталонным полипептидом за связывание с соответствующей мишенью обычно может быть определена с использованием стандартного конкурентного анализа, известного в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления конкуренция не требует, чтобы полипептид конкурировал за тот же эпитоп, что и полипептид (DD) из Таблицы 1, скорее, полипептид может конкурировать, связывая стерически ингибирующий эпитоп, перекрывающийся эпитоп и т.д.

Созревание аффинности и де-иммунизация DD и DDpp

[0347] Стратегии созревания аффинности можно использовать для создания DD и DDpp с высокой аффинностью, которые можно использовать в описанных в данном документе слитых белках DDpp. Улучшенные DD и DDpp, которые специфически связывают представляющую интерес мишень (например, VCAM, CD123, CS1, HER2, AFP и p26 AFP), также могут быть созданы на основе известной эталонной последовательности DDpp. Например, по меньшей мере одна, две, три, четыре, пять или более аминокислотных мутаций (например, консервативные или неконсервативные замены), делеции или вставки могут быть введены в последовательность DD, раскрытую в Таблице 1 (то есть эталонную последовательность) и полученный DDpp может быть подвергнут скринингу на связывание с соответствующей мишенью и биологическую активность, такую как способность антагонизировать биологическую активность соответствующей мишени или агонизировать биологическую активность соответствующей мишени.

[0348] Диссоциированный DDpp, особенно введенный субъекту, предпочтительно не является антигенным по отношению к субъекту (например, человеку). В некоторых вариантах осуществления последовательность DDpp не содержит человеческого HLA-DR-связывающего мотива или сайтов расщепления для протеасом и иммунных протеасом. В конкретных вариантах осуществления последовательность DDpp не содержит антигенной последовательности, как определено версией модели компьютерного прогнозирования,

существующей на дату подачи данного изобретения. В конкретных вариантах осуществления последовательность DDpp не содержит последовательность сайтов связывания ГКГС (класс I или класс II), как предсказано алгоритмом, выбранным из ProPred (см., например, Singh, *Bioinformatics* 17(12): 1236-1237 (2001)), ProPred1 (Singh, *Bioinformatics* 19(8): 1009-14 (2003)), SYFPEITHI (см., например, Schuler, *Immunoinf. Meth. in Mol. Biol.* 409(1): 75-93 (2007)), SMM-align (см., например, Nielsen, *BMC Bioinformatics* 8: 238 (2007)), RANKPEP (см., например, Reche, *Hum Immunol* 63: 701-709. (2004)) или TERITOPRE (см., Sturniolo, *Nat Biotechnol* 17: 555-561 (1999)), где версия алгоритма и применяемая база данных существуют на дату подачи данной заявки. В некоторых вариантах осуществления DDpp не содержит последовательности, которая обладает характеристиками с высокой аффинностью (порог связывания менее 6 %) Т-клеточного эпитопа. (Singh, *Bioinformatics* 17: 1236-1237 (2001)). В некоторых вариантах осуществления DDpp не содержит последовательности, которая имеет общие характеристики с универсальным (присутствующим в более чем 50 % соответствующих аллелей) эпитопом Т-клеток (Singh, *Bioinformatics* 17: 1236-1237 (2001)). В некоторых вариантах осуществления DDpp не содержит последовательности, которая обладает характеристиками с высокой аффинностью или универсальный Т-клеточный эпитоп. В конкретных вариантах DDpp не содержит последовательность LAAIKTRLQ (SEQ ID NO: 2). В данной области техники известны способы создания, скрининга и идентификации вариантов DDpp со зрелой аффинностью и вариантов связывания DDpp с мишенью, содержащих изменение последовательности, которое удаляет предсказанную последовательность сайта связывания ГКГС (класс I или класс II).

Промышленные изделия

[0349] В данном документе предложены промышленные изделия, в том числе комплекты. Изделие может содержать контейнер и размещенную с контейнером или находящуюся на нем этикетку или вкладыш в упаковку. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы или шприцы. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит один или более DDpp, нуклеиновых кислот, кодирующих DDpp и/или векторов или клеток-хозяев по данному изобретению. Этикетка или вкладыш в упаковку могут включать содержать указания для выполнения скрининга и/или обнаружения на основе аффинности

[0350] Также предложены наборы, содержащие DDpp. Такие наборы имеют применение, включая, без ограничения, обнаружение представляющей интерес мишени, с которой специфически связывается DDpp (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или

p26 AFP). Такой набор для анализа может быть пригоден для скрининга на присутствие представляющей интерес мишени и/или количественного определения концентраций представляющей интерес мишени в жидкости, такой как биологическая жидкость (например, кровь, сыворотка или синовиальная жидкость).

[0351] В одном варианте осуществления рассматривается набор для анализа DDpp, который содержит один или более контейнеров DDpp, которые специфически связывают представляющей интерес мишень, и, необязательно, средство обнаружения для определения наличия или отсутствия взаимодействия мишени/DDpp или его отсутствия. Кроме того, набор необязательно содержит представляющий интерес белок (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP), который можно использовать, например, в качестве контроля или стандарта. DDpp может быть свободным или экспрессироваться на поверхности клетки-хозяина или на поверхности бактериофага. В конкретном варианте осуществления DDpp или представляющая интерес мишень, представленная в наборе, может быть мечен. Можно использовать любую метку, известную в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления метку выбирают из группы, состоящей из биотина, фторогена, фермента, эпитопа, хромогена или радионуклида. В некоторых вариантах осуществления DDpp иммобилизован на твердой подложке. Средства обнаружения, используемые для обнаружения метки, будут зависеть от природы метки и могут быть любыми известными в данной области техники, например пленка для обнаружения радионуклида; субстрат фермента, который вызывает или усиливает обнаруживаемый сигнал для обнаружения присутствия представляющей интерес мишени.

[0352] Предпочтительно набор дополнительно содержит твердую подложку для DDpp, которая может быть предоставлена в виде отдельного элемента или на которой иммобилизован DDpp, которой специфически связывает представляющую интерес мишень (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP). Следовательно, DDpp, который специфически связывает представляющую интерес мишень в наборе, может быть иммобилизован на твердой подложке, или они могут быть иммобилизованы на такой подложке, которая входит в комплект или поставляется отдельно от комплекта. Предпочтительно DDpp наносят на микротитровальный планшет. В некоторых вариантах осуществления обнаружение включает применение молекулы, усиливающей сигнал. Когда молекула, усиливающая сигнал, представляет собой фермент, набор необязательно дополнительно содержит субстраты и кофакторы, необходимые для фермента, и при этом молекула-амплификатор представляет собой флуорофор. Набор необязательно дополнительно содержит предшественник красителя, который обеспечивает обнаруживаемый хромофор.

[0353] Набор также может содержать инструкции по проведению анализа, а также другие добавки, такие как стабилизаторы, промывочные и инкубационные буферы и тому подобное. Компоненты набора будут предложены в заранее определенных соотношениях, причем относительные количества различных реагентов соответственно варьируют для обеспечения концентраций в растворе реагентов, которые по существу максимизируют чувствительность анализа. В частности, реагенты могут быть предоставлены в виде сухих порошков, обычно лиофилизированных, включая наполнители, которые при растворении обеспечат раствор реагента, имеющий подходящую концентрацию, для объединения с исследуемым образцом.

[0354] Различные форматы и методы анализа связывания, которые можно использовать, известны в данной области техники и включают, без ограничения, иммобилизацию на фильтрах, таких как нейлон или нитроцеллюлоза; двумерные массивы, иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА), анализы конкурентного связывания, прямой и непрямой сэндвич-анализ, иммунопреципитационные анализы, флуориметрический анализ микрообъемов (FMAT™), анализы системы Luminex™, перенос энергии флуоресцентного резонанса (FRET), биолюминесцентный резонансный перенос энергии (BRET), электроиммуноанализы, AlphaScreen™, методы, основанные на наночастицах, и поверхностный плазмонный резонанс (ППР).

[0355] Анализы связывания могут быть гомогенными или полугомогенными. Гомогенный анализ представляет собой анализ, в котором все компоненты смешиваются, инкубируются и затем анализируются. Полугомогенный анализ - это тот, в котором большая часть реакции происходит в виде сложной смеси, но перед добавлением конечного реагента и анализа требуется стадия промывки, в отличие от типичного многослойного анализа с поэтапной сборкой, где каждый компонент добавлен, затем смывается до добавления следующего компонента. В некоторых вариантах осуществления анализ представляет собой иммуноанализ. В определенных вариантах осуществления анализ представляет собой полугомогенный иммуноферментный анализ (EIA).

Применение

[0356] DDpp, отдельно, в виде слитых белков, в качестве химических конъюгатов или в качестве других вариантов осуществления, описанных в данном документе, имеет множество применений. В некоторых вариантах осуществления DDpp применяется в качестве реагентов для обнаружения, диагностических реагентов или аналитических реагентов. Некоторые варианты осуществления имеют применения *in vivo*, *in vitro* и/или *ex vivo*. Способы, в которых DDpp применяются *in vitro*, могут быть выполнены в различных форматах, таких как микропланшеты, белковые матрицы, поверхности

биосенсоров, срезы тканей и дополнительные форматы, которые очевидны для специалиста в данной области техники. Аналогично, способы, в которых DDpp применяются *in vivo*, могут использоваться в различных форматах, которые включают, без ограничения, слитые белки DDpp-Fc, клетки CAR и мультиспецифические антитела DDpp. В конкретных вариантах осуществления DDpp, такой как слитые белки DDpp, применяют в качестве терапевтического агента.

Аналитические и диагностические применения

[0357] DDpp, отдельно, в виде слитых белков, в качестве химических конъюгатов или в качестве других вариантов осуществления, описанных в данном документе, имеет множество применений. В некоторых вариантах осуществления DDpp применяют в качестве реагентов для обнаружения представляющих интерес объектов во множестве различных типов образцов.

[0358] В одном варианте осуществления DDpp используются для обнаружения представляющих интерес мишеней в растворах, участвующих в производственных процессах, таких как экспрессия белка. Образцы могут включать, без ограничения, воду, буферы, образцы для очистки в процессе, объемное лекарственное вещество и конечный лекарственный продукт. В дополнительных вариантах осуществления DDpp можно применять для обнаружения загрязнений из образца, такого как источник подачи воды или воды (или другой жидкости), используемой в производстве.

[0359] В другом варианте осуществления DDpp применяют для обнаружения представляющих интерес мишеней в диагностических образцах. Образцы могут включать, без ограничения, гомогенаты тканей, клеточные экстракты, образцы биопсии, сыворотку, плазму, лимфу, кровь, фракции крови, мочу, синовиальную жидкость, спинномозговую жидкость, слюну, слизистую, мокроту, плевральную жидкость, аспирационный биоптат сосков, жидкость дыхательных путей, кишечника и мочеполового тракта, слезную жидкость, грудное молоко, жидкость из лимфатической системы, сперму, спинномозговую жидкость, жидкость из внутренних органов, асцитическую жидкость, жидкость из опухолевых кист, аминотическую жидкость и среда или лизат из культивируемых клеток.

[0360] В одном варианте осуществления DDpp полезны для обнаружения присутствия фактора или множества факторов (например, антигенов или организмов) в биологическом образце. В контексте данного документа термин «выявление» включает количественное или качественное выявление. В определенных вариантах осуществления биологический образец содержит клетку, ткань или жидкость. В определенных вариантах осуществления такие ткани включают нормальные и/или раковые ткани.

[0361] Различные форматы и методики обнаружения известны в данной области техники и включают, без ограничения, вестерн-блот-анализ, иммуногистохимию, ИФА, анализ FACS, ферментные анализы, автордиографию и любые из анализов связывания, упомянутых в данном документе.

[0362] В одном варианте осуществления предложен способ для обнаружения представляющей интерес мишени (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP) в растворе, содержащем мишень, включающий: (а) приведение в контакт раствора с DDpp, который специфически связывает представляющую интерес мишень в условиях, подходящих для специфического связывания DDpp с мишенью, и (б) обнаружение связывания DDpp и мишени. DDpp может быть свободным или иммобилизованным. Обеспечивают достаточное время для связывания между представляющей интерес мишенью и DDpp, и несвязывающие компоненты в растворе или смеси удаляют или вымывают. Образование связывающего комплекса между DDpp и представляющей интерес мишенью затем можно обнаружить, например, путем обнаружения сигнала от метки на DDpp, которая является одним из компонентов связывающего комплекса. Метка может быть любой меткой, которая создает сигнал, который может быть обнаружен стандартными методами, такими как флуоресцентная метка, радиоактивное соединение или фермент, который реагирует с субстратом, чтобы создать обнаруживаемый сигнал. Примеры подходящих меток для таких целей описаны в данном документе и/или иным образом известны в данной области техники.

[0363] DDpp, который связывается с представляющей интерес мишенью, такой как BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP, можно детектируемо пометить с помощью радиоизотопов, аффинных меток (таких как биотин, авидин и т.д.), ферментативных меток (таких как в качестве пероксидазы хрена, щелочной фосфатазы и т.д.) с использованием способов, известных в данной области техники, таких как описанные в WO 00/70023 и (Harlow and Lane (1989) *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 1-726).

[0364] Обнаруживаемый маркер или метка может быть любым, который способен прямо или косвенно создавать измеримый сигнал, такой как радиоактивный, хромогенный, люминесцентный или флуоресцентный сигнал, который можно использовать для количественного определения количества связанной обнаруживаемой части или метки в образце. Обнаруживаемые метки, известные в данной области, включают радиоизотопы, такие как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I , электрохемилюминесцентные метки (такие как катализатор на основе рутения (Ru) в сочетании с субстратами и т.д.), люминесцентные или биолюминесцентные метки (например, европий, ванадий), флуоресцентные или хемилюминесцентные соединения, такие как изотиоцианат

флуоресцеина, родамин или люциферин, ферменты (например, фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена), колориметрические метки, такие как коллоидное золото, цветные стеклянные или пластиковые шарики (например, полистирол, полипропилен, латекс и т.д.), парамагнитные атомы или магнитные агенты, электронно-плотные реагенты, нано- или микрошарики, содержащие флуоресцентный краситель, нанокристаллы, квантовую точку, квантовый шарик, нанометку, дендримеры с флуоресцентной меткой, микротранспондер, донор электронов, молекулу или молекулярную структуру, или светоотражающую частицу, микрочастицы могут быть нанокристаллами или квантовыми точками. Нанокристаллы представляют собой вещества, которые поглощают фотоны света, а затем переизлучают фотоны с другой длиной волны (флуорофоры). Кроме того, дополнительные флуоресцентные метки или вторичные антитела могут быть конъюгированы с нанокристаллами. Нанокристаллы коммерчески доступны из таких источников, как Invitrogen и Evident Technologies (Трой, N.Y.). Другие метки включают E)-5-[2-(метоксикарбонил) этенил]цитидин, который представляет собой нефлуоресцентную молекулу, которая при воздействии ультрафиолетового (УФ) излучения дает продукт 3-бета-D-рибофуранозил-2,7-диоксопиродо [2,3-d] пиримидин, который показывает сильный сигнал флуоресценции.

[0365] Конкурентное ингибирование может быть определено любым способом, известным в данной области техники, например, конкурентным ИФА. Говорят, что DDpp, такой как слитый белок DDpp (например, DDpp-Fc, DDpp-CAR, DDpp-scFv) или другая молекула, "конкурентно ингибирует" связывание эталонной молекулы с данным эпитопом, если он связывается с этим эпитопом в той степени, в которой он до некоторой степени блокирует связывание эталонной молекулы с эпитопом. В контексте данного описания можно сказать, что DDpp (например, слитый белок DDpp) или другая молекула конкурентно ингибируют связывание эталонной молекулы с данным эпитопом, например, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере 70 %, по меньшей мере на 60 %, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 30 % или по меньшей мере на 20 %. Термины «конкурировать», «способность конкурировать» и «конкурировать с» являются относительными терминами, используемыми для описания DDpp, такого как слитый белок DDpp, который обеспечивает по меньшей мере 20 %, по меньшей мере 30 %, по меньшей мере 40 %, или по меньшей мере 50 % ингибирования связывания эталонной молекулы с мишенью посредством DDpp, такого как слитый белок DDpp (например, DDpp-Fc, DDpp CAR, DDpp-scFv и антитело, содержащее DDpp), как определено стандартным конкурентным анализом, как описано в данном документе или иным образом известный в данной

области техники, включая, без ограничения, системы конкурентного анализа с использованием таких методов, как радиоиммуноанализ (РИА), иммуноферментный анализ (EIA), предпочтительно иммуноферментный анализ (ИФА) «сэндвич»-иммуноанализы, иммунорадиометрические анализы, флуоресцентные иммуноанализы, люминесцентные, электрохимические люминесцентные и иммуноэлектрофорезные анализы. Способы определения связывания и аффинности молекул-кандидатов на связывание известны в данной области техники и включают, без ограничения, аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию по размеру, равновесный диализ, смещение флуоресцентного зонда и плазменный резонанс.

Терапевтические средства

[0366] Описанные в данном документе DD могут быть использованы во множестве применений, включая, без ограничения, способы терапевтического лечения, которые могут быть способами *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

[0367] Применение в качестве терапевтического средства является атрибутом специфичности связывания мишени DDpp. Включение DDpp в различные молекулярные композиции (например, слитые белки DD-антитело, конъюгаты DD-лекарственное средство и DD-химерный рецептор) позволяет применять различные терапевтические средства и способы, которые включают, без ограничения, растворимые и клеточно-ассоциированные композиции.

[0368] В одном варианте осуществления DDpp представляет собой растворимый слитый белок, состоящий из необязательной эпитопной метки 10 и нацеливающего домена, который связывается с мишенью, которая связана с заболеванием или нарушением метаболической, сердечно-сосудистой, скелетно-мышечной, неврологической или скелетной системы. В других вариантах осуществления DDpp представляет собой растворимый слитый белок, который связывается с мишенью, которая связана с инфекцией или заболеванием, вызванными дрожжами, грибами, вирусами или бактериями. В некоторых вариантах осуществления DDpp представляет собой растворимый слитый белок, который связывается с мишенью, которая связана с заболеванием или расстройством иммунной системы.

[0369] Также предложены терапевтические композиции, пригодные для осуществления терапевтических способов, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления терапевтические композиции, предложенные в данном документе, содержат физиологически переносимый носитель вместе с по меньшей мере одним видом слитого DDpp, как описано в данном документе, растворенным или диспергированным в нем в качестве активного ингредиента. В другом варианте

осуществления терапевтические композиции, предложенные в данном документе, содержат физиологически переносимый носитель вместе с по меньшей мере одним видом DDpp, как описано в данном документе, растворенным или диспергированным в нем в качестве активного ингредиента. В предпочтительном варианте осуществления терапевтическая композиция не является иммуногенной при введении пациенту-человеку для терапевтических целей.

[0370] Приготовление фармакологической композиции, содержащей растворенные или диспергированные в ней активные ингредиенты, хорошо известно в данной области техники. Обычно такие композиции готовят в виде стерильных инъекционных растворов в виде жидких растворов или суспензий, водных или неводных. Однако твердые формы, подходящие для раствора или суспензии, в жидкости перед использованием также могут быть приготовлены. Препарат также может быть эмульгирован. Таким образом, содержащая DDpp композиция может иметь форму растворов, суспензий, таблеток, капсул, составов с замедленным высвобождением или порошков или других композиционных форм. В некоторых вариантах осуществления композиции DDpp (например, слитые белки DDpp) составлены для обеспечения или оптимизации распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) исключает многие высокогидрофильные соединения, и, если это желательно, композиции готовят так, чтобы увеличить перенос через ГЭБ, например, путем заключения в липосомах. Относительно способов получения липосом см., например, патенты США № 4522811, 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или более компонентов, которые избирательным образом переносятся в конкретные клетки или органы, улучшая, таким образом, целевую доставку лекарства (см., например, Ranade, Clin. Pharmacol. 29: 685 (1989)).

[0371] DDpp (например, слитый гормон DDpp) может быть смешан с другими активными ингредиентами и/или эксципиентами, которые являются фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом и в количествах, подходящих для использования в терапевтических способах, описанных в данном документе. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин, этанол или тому подобное и их комбинации. Кроме того, если желательно, композиция может содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты и подобные, известные в данной области техники, которые повышают эффективность активного ингредиента.

[0372] Терапевтический DDpp могут включать фармацевтически приемлемые соли

содержащихся в них компонентов. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, полученные посредством добавления кислоты (образованные с помощью свободных аминогрупп полипептида), которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, винная, миндальная и тому подобные. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиларнин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и тому подобные.

[0373] Физиологически переносимые носители известны в данной области техники. Примерами жидких носителей являются стерильные водные растворы, которые не содержат материалов в дополнение к активным ингредиентам и воде или содержат буфер, такой как фосфат натрия при физиологическом значении pH, физиологический раствор или оба, такие как забуференный фосфатом физиологический раствор. Кроме того, водные носители могут содержать более одной буферной соли, а также соли, такие как хлориды натрия и калия, декстрозу, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и другие растворенные вещества.

[0374] Жидкие композиции могут также содержать жидкие фазы в дополнение к воде и за исключением воды. Примерами таких дополнительных жидких фаз являются глицерин, растительные масла, такие как хлопковое масло, органические сложные эфиры, такие как этилолеат, и водно-масляные эмульсии.

[0375] В одном варианте осуществления терапевтическая композиция содержит слитый белок DDpp, обычно в количестве, по меньшей мере, 0,1 мас.% слитого белка DDpp на массу общей терапевтической композиции. Массовый процент представляет собой отношение массы слитого DDpp к общей композиции. Так, например, 0,1 мас. процента составляет 0,1 г DDpp на 100 г общей композиции.

[0376] Терапевтическая композиция, содержащая слитый белок DDpp, обычно содержат от около 10 микрограмм (мкг) на миллилитр (мл) до около 100 микрограмм (мг) на мл слитого белка DDpp в качестве активного ингредиента на объем композиции и более предпочтительно содержат от около 1 мг/мл до около 10 мг/мл (т.е., приблизительно от 0,1 до 1 мас. процента).

[0377] Диапазоны доз для введения DDpp (например, слитого белка DDpp) достаточно велики для достижения желаемого эффекта, при котором симптомы заболевания, опосредуемые молекулой-мишенью, уменьшаются. Дозировка не должна быть настолько большой, чтобы вызывать побочные эффекты, такие как синдромы

повышенной вязкости, отек легких, застойная сердечная недостаточность и тому подобное. Как правило, дозировка будет варьировать в зависимости от возраста, состояния, пола и степени заболевания у пациента и может быть определена специалистом в данной области техники. Дозировка может корректироваться лечащим врачом в случае наличия каких-либо осложнений.

[0378] DDpp (например, слитый белок DDpp) можно вводить парентерально путем инъекции или постепенной инфузии с течением времени. Хотя к молекуле-мишени обычно можно получить доступ в организме путем системного введения и, следовательно, чаще всего ее лечат путем внутривенного введения терапевтических композиций, другие ткани и средства доставки рассматриваются там, где существует вероятность того, что ткань-мишень содержит молекулу-мишень. Таким образом, DDpp можно вводить внутривенно, внутривентриально, внутримышечно, подкожно, внутримышечно, транскутанно и может доставляться перистальтическими средствами. Слитые белки DDpp также могут быть доставлены аэрозолем в дыхательные пути и легкие.

[0379] Терапевтические композиции, содержащие DDpp, могут обычно вводиться внутривенно, например, путем инъекции разовой дозы. Термин «разовая доза» при использовании в отношении терапевтической композиции, предложенной в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичной дозы для субъекта, причем каждая единица содержит заранее определенное количество активного материала, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым разбавителем, например, носителем или несущей средой. В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции, содержащие DDpp, вводят подкожно.

[0380] DDpp (например, слитый белок DDpp) вводят способом, совместимым с лекарственной формой, и в терапевтически эффективном количестве. Количество, которое следует вводить, зависит от подлежащего лечению субъекта, способности системы субъекта использовать активный ингредиент вводимой композиции и желаемой степени терапевтического эффекта. Точные количества активного ингредиента, необходимые для введения, зависят от суждения практикующего врача и являются индивидуальными для каждого человека. Однако подходящие диапазоны доз для системного применения раскрыты в данном документе и зависят от пути введения. Подходящие режимы для введения также являются переменными, но они типичны для начального введения с последующими повторными дозами с интервалом в один или более часов с последующей инъекцией или другим введением. Альтернативно, предполагается непрерывная внутривенная инфузия, достаточная для поддержания концентраций в крови в диапазонах,

указанных для терапии *in vivo*.

[0381] Композиции DDpp составляются, дозируются и вводятся способом, соответствующим хорошей медицинской практике. Факторы, подлежащие рассмотрению в этом контексте, включают конкретное расстройство, которое лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, график введения и другие факторы, известные врачам. Диапазоны доз для введения DDpp достаточно велики для достижения желаемого эффекта, при котором симптомы заболевания, опосредуемые молекулой-мишенью, уменьшаются. Дозировка не должна быть настолько большой, чтобы вызывать побочные эффекты, такие как синдромы повышенной вязкости, отек легких, застойная сердечная недостаточность и тому подобное. Как правило, дозировка будет варьировать в зависимости от возраста, состояния, пола и степени заболевания у пациента и может быть определена специалистом в данной области техники. Дозировка может корректироваться лечащим врачом в случае наличия каких-либо осложнений.

[0382] Схема дозировки и количества, эффективные для терапевтического и профилактического применения, т.е., «режим дозирования», будут зависеть от множества факторов, включая причину, стадию и тяжесть заболевания или расстройства, здоровье, физическое состояние, возраст млекопитающего, подвергаемого лечению, а также место и способ доставки DD. Терапевтическая эффективность и токсичность комплекса и образования может быть определена с помощью стандартных фармацевтических, фармакологических и токсикологических процедур на клеточных культурах или экспериментальных животных. Данные, полученные в результате этих процедур, также могут быть использованы при составлении диапазона дозировок для применения человеком. Кроме того, терапевтический индекс (т.е., доза, терапевтически эффективная для 50 процентов населения, деленная на смертельную дозу для 50 процентов населения (ED₅₀/LD₅₀)), может быть легко определена с использованием известных процедур. Дозировка предпочтительно находится в пределах диапазона концентраций, который включает ED₅₀ с незначительной токсичностью или без токсичности, и может варьировать в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы, чувствительности пациента и пути введения.

[0383] Режим дозирования также принимает во внимание параметры фармакокинетики, известные в данной области техники, такие как скорость всасывания лекарственного средства, биодоступность, метаболизм и клиренс (см., например, Hidalgo-Aragones, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58: 611-617 (1996); Groning et al., Pharmazie 51: 337-341 (1996); Fotherby, Contraception 54: 59-69 (1996) и Johnson et al., J. Pharm. Sci. 84:

1144–1146 (1995)). В настоящее время клиницист в соответствии с состоянием и уровнем квалификации вполне может определить режим дозирования для каждого субъекта, которого лечат. Кроме того, разовое или многократное введение композиций DDpp можно вводить в зависимости от дозировки и частоты, которые требуются и переносятся субъектом. Продолжительность профилактического и терапевтического лечения будет варьировать в зависимости от конкретного заболевания или состояния, подлежащего лечению. Некоторые заболевания поддаются острому лечению, тогда как другие требуют длительной хронической терапии. DDpp можно вводить последовательно или одновременно с дополнительным терапевтическим средством.

[0384] В некоторых вариантах осуществления DDpp вводят в количестве от около 1 мг/кг до около 50 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 25 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 20 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 15 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 10 мг/кг или от около 1 до около 5 мг/кг.

[0385] В другом варианте осуществления DDpp вводят в сочетании с одним или более дополнительными терапевтическими средствами.

[0386] Терапевтически эффективное количество DDpp (например, слитого белка DDpp) может быть таким, чтобы при введении в физиологически переносимой композиции было достаточно для достижения концентрации в плазме от около 0,1 микрограмма (мкг) на миллилитр (мл) до около 100 мкг/мл, предпочтительно от около 1 мкг/мл до около 5 мкг/мл и обычно около 5 мкг/мл. Иными словами, дозировка может варьировать от около 0,1 мг/кг до около 300 мг/кг, предпочтительно от около 0,2 мг/кг до около 200 мг/кг, наиболее предпочтительно от около 0,5 мг/кг до около 20 мг/кг. один или более приемов дозы ежедневно, в течение одного или нескольких дней.

[0387] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе DDpp пригоден для лечения заболевания или расстройства иммунной системы, такого как воспаление или аутоиммунное заболевание.

[0388] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе DDpp пригоден для лечения рака. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ лечения рака, который включает введение терапевтически эффективного количества DDpp (например, слитого DDpp) пациенту.

[0389] В дополнительных вариантах осуществления в данном изобретении предложен химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит нацеливающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления домен нацеливания состоит по меньшей мере частично из связывающего с мишенью DDpp, раскрытого в данном документе.

[0390] В данном изобретении также предложены клетки, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, причем CAR содержит антигенсвязывающий домен, состоящий, по меньшей мере, частично из раскрытого полипептида, который связывает представляющую интерес мишень (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP и p26 AFP), трансмембранный домен и сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR специфически связывается с опухолевым антигеном (и, таким образом, функционирует для доставки клетки, экспрессирующей CAR, в опухоль). В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген связан с гематологическим злокачественным новообразованием. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой BCMA. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой CD123. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой CS1. В дополнительных вариантах осуществления опухолевый антиген связан с солидной опухолью. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой HER2. В некоторых вариантах осуществления мишенями являются как солидные, так и гематологические новообразования. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, представляет собой Т-клетку, клетку естественного киллера (NK) или клетку другого иммунного типа. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR (будь то Т-клетка, NK-клетка или клетка другого типа), проявляет противоопухолевый иммунитет, когда полипептид связывается с соответствующим опухолевым антигеном.

[0391] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества иммунной клетки CAR, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит домен связывания мишени, который содержит DD, который специфически связывает BCMA (например, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306), трансмембранный домен и внутриклеточный домен (содержащий сигнальный домен). В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR не является Т-клеткой или NK-клеткой. В других вариантах осуществления субъекту вводят комбинацию различных типов иммунных клеток CAR (например, NK-клеток и Т-клеток).

[0392] В некоторых вариантах осуществления домен связывания мишени введенной иммунной клетки CAR специфически связывает BCMA, экспрессируемый

раковой клеткой субъекта, и индуцирует иммунную клетку CAR для создания цитотоксического сигнала, который приводит к цитотоксическим эффектам в отношении раковой клетки, таким образом обеспечивая лечение рака.

[0393] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества иммунной клетки CAR, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит домен связывания мишени, который содержит DD, который специфически связывает CD123 (например, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 307-739 и 740), трансмембранный домен и внутриклеточный домен (содержащий сигнальный домен). В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR не является Т-клеткой или NK-клеткой. В других вариантах осуществления субъекту вводят комбинацию различных типов иммунных клеток CAR (например, NK-клеток и Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления домен связывания мишени введенной иммунной клетки CAR специфически связывает CD123, экспрессируемый раковой клеткой субъекта, и индуцирует иммунную клетку CAR для создания цитотоксического сигнала, который приводит к цитотоксическим эффектам в отношении раковой клетки, таким образом обеспечивая лечение рака.

[0394] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества иммунной клетки CAR, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит домен связывания мишени, который содержит DD, который специфически связывает CS1 (например, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 896-909 и 910), трансмембранный домен и внутриклеточный домен (содержащий сигнальный домен). В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR не является Т-клеткой или NK-клеткой. В других вариантах осуществления субъекту вводят комбинацию различных типов иммунных клеток CAR (например, NK-клеток и Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления домен связывания мишени введенной иммунной клетки CAR специфически связывает CS1, экспрессируемый раковой клеткой субъекта, и индуцирует иммунную клетку CAR для

создания цитотоксического сигнала, который приводит к цитотоксическим эффектам в отношении раковой клетки, таким образом обеспечивая лечение рака.

[0395] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества иммунной клетки CAR, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит домен связывания мишени, который содержит DD, который специфически связывает HER2 (например, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 911-949 и 950), трансмембранный домен и внутриклеточный домен (содержащий сигнальный домен). В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка CAR не является Т-клеткой или NK-клеткой. В других вариантах осуществления субъекту вводят комбинацию различных типов иммунных клеток CAR (например, NK-клеток и Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления домен связывания мишени введенной иммунной клетки CAR специфически связывает HER2, экспрессируемый раковой клеткой субъекта, и индуцирует иммунную клетку CAR для создания цитотоксического сигнала, который приводит к цитотоксическим эффектам в отношении раковой клетки, таким образом обеспечивая лечение рака.

[0396] Дополнительно предложены способы лечения или профилактики рака, включающие введение DDpp-CAR Т-лимфоцита пациенту, предрасположенному к или имеющему рак, который экспрессирует опухолевый антиген на поверхности клеток-мишеней, и при этом DDpp специфически связывает антиген.

[0397] В некоторых вариантах осуществления, в которых Т-клетки CAR вводят субъекту, имеющему рак, связывание представляющей интерес мишени (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP) стимулирует Т-клетки CAR для инициирования внутриклеточного сигналинга. В других вариантах осуществления связывание Т-клетки CAR с представляющей интерес мишенью стимулирует Т-клетку для инициирования внутриклеточного сигналинга и продуцирования цитокинов. В других вариантах осуществления связывание Т-клетки CAR с представляющей интерес мишенью стимулирует Т-клетку инициировать внутриклеточный сигналинг, продуцировать цитокины и дегранулировать, что приводит к цитотоксическому эффекту в отношении раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления CAR Т-клетки пролиферируют в ответ на связывание представляющей интерес мишени. Преимущественно, в некоторых вариантах осуществления активность CAR Т-клеток не приводит к тому, что Т-клетки

демонстрируют фенотип, связанный с истощением Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен Т-клетки CAR содержит 41BB или CD28, а цитоплазматический домен содержит альфа-, бета- или дзета-цепь рецептора Т-клетки.

[0398] В некоторых вариантах осуществления введенный CAR дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5, DD и/или других связывающих доменов (например, scFv), которые специфически связывают представляющую интерес мишень (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP), экспрессируемую раковой клеткой. В дополнительных вариантах осуществления вводимый CAR дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5, DD или других связывающих доменов (например, scFv), которые специфически связывают другую представляющую интерес мишень, экспрессируемую раковой клеткой. В дополнительных вариантах осуществления вводимый CAR дополнительно содержит 2, 3, 4, 5 или более 5, DD или других связывающих доменов (например, scFv), которые специфически связывают другую представляющую интерес мишень, экспрессируемую другой раковой клеткой или сосудистой эндотелиальной клеткой.

[0399] В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка дополнительно содержит второй полипептид CAR, имеющий DD или другой связывающий домен (например, scFv), который специфически связывает вторую представляющую интерес мишень, экспрессируемую раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления введенная иммунная клетка дополнительно содержит второй полипептид CAR, имеющий DD или другой связывающий домен (например, scFv), который специфически связывает вторую представляющую интерес мишень, экспрессируемую другой раковой клеткой или сосудистой эндотелиальной клеткой.

[0400] В некоторых вариантах осуществления введение иммунных клеток с помощью CAR является внутривенным. В других вариантах осуществления иммунные клетки с CAR вводят внутриартериальным, внутримышечным, местным или другим приемлемым путем для данного сценария лечения.

[0401] В некоторых вариантах осуществления в данном документе также предложены способы лечения субъекта, имеющего рак, включающие: введение субъекту иммунной клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит: домен связывания мишени, причем домен связывания мишени содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306; SEQ ID NO: 307-739 и 740; SEQ ID NO: 741-874 и 886-895; SEQ ID NO: 896-909 и 910 или SEQ ID NO: 911-949 и 950; причем полипептид специфически связывает представляющую интерес мишень (например, BCMA, CD123,

CS1, HER2, AFP или p26 AFP), экспрессируемую раковой клеткой.

[0402] В дополнительных вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий: внутривенное введение субъекту иммунной клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), экспрессируемой на Т-клетке, причем CAR содержит: домен связывания мишени, содержащий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306; SEQ ID NO: 307-739 и 740; SEQ ID NO: 741-874 и 886-895; SEQ ID NO: 896-909 и 910 или SEQ ID NO: 911-949 и 950; трансмембранный домен, выбранный из 41BB и CD28, и внутриклеточный домен, причем внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, выбранный из альфа-, бета- или дзета-цепи рецептора Т-клеток, при этом при введении субъекту, имеющему рак, домен связывания мишени специфически связывается с представляющей интерес мишенью (например, BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP), экспрессируемой раковой клеткой, и при этом связывание представляющей интерес мишени индуцирует CAR Т-клетку для создания цитотоксических сигналов, что приводит к цитотоксическому воздействию на раковые клетки. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические эффекты являются результатом дегрануляции CAR Т-клеток. Преимущественно, в некоторых вариантах осуществления активация и цитотоксическая активность CAR Т-клеток не связана с CAR Т-клетками, проявляющими фенотип, связанный с истощением Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR необязательно дополнительно содержит второй домен связывания мишени, содержащий второй полипептид, имеющий мишень, отличную от домена связывания мишени. В других вариантах осуществления дополнительные нацеливающие домены могут быть необязательно включены для усиления способности связывания с маркером или для придания специфичности связывания другим маркерам.

[0403] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложено применение иммунной клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), для лечения рака, причем CAR содержит: домен связывания мишени, содержащий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-305 и 306; SEQ ID NO: 307-739 и 740; SEQ ID NO: 741-874 и 886-895; SEQ ID NO: 896-909 и 910 или SEQ ID NO: 911-949 и 950; трансмембранный домен, выбранный из 41BB и CD28, и внутриклеточный домен, причем внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, выбранный из альфа-, бета- или дзета-цепи рецептора Т-клеток, при этом при введении субъекту, имеющему рак, домен связывания мишени специфически связывается с представляющей интерес мишенью (например, BCMA,

CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP), экспрессируемой раковой клеткой, и при этом связывание представляющей интерес мишени индуцирует иммунную клетку для создания цитотоксических сигналов, что приводит к цитотоксическому воздействию на раковые клетки. В других вариантах осуществления иммунная клетка может представлять собой Т-клетку или клетку естественного киллера (NK).

[0404] Рак, который можно лечить, включает опухоли, которые не являются васкуляризованными или еще по существу не васкуляризованными, а также васкуляризованные опухоли. Рак может включать несолидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкозы и лимфомы) или может включать солидные опухоли. Типы раковых заболеваний, подлежащих лечению DDpp, включают, без ограничения, карциному, бластому и саркому, а также некоторые лейкозы или лимфоидные злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли и злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Также включены взрослые опухоли/раковые заболевания и детские опухоли/раковые заболевания.

[0405] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе DDpp пригоден для лечения пациента с гематологическим раком. Примеры гематологических (или гематогенных) раковых заболеваний включают лейкозы, включая острые лейкозы (такие как острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобласты, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз), хронические лейкозы (такие как хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (индолентные формы и формы высокой степени злокачественности), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелой цепи, миелодиспластический синдром, волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазию. В некоторых вариантах гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому.

[0406] Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, рак толстой кишки, лимфоидную злокачественную опухоль, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточный рак, базально-клеточный рак, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярную карциному щитовидной

железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитомальную карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, рак желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, семиному, рак мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (например, глиома ствола головного мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома) астроцитомы, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, краниофарингиома Шваннома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома, акустическая неврома, олигодендроглиома, менангиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головной мозг). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы или рак яичника.

[0407] В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp связывает (1) мишень на представляющей интерес клетке или ткани (например, опухолевый антиген на опухолевой клетке) и (2) мишень на эффекторной клетке, такой как молекулу рецептора Т-клетки. В соответствии с одним вариантом осуществления связывание одной или более мишеней слитым белком DDpp используется для направления иммунного ответа на инфекционный агент, клетку, ткань или другое представляющее интерес место у пациента. Например, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp специфически связывает мишень на поверхности эффекторной клетки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp специфически связывает мишень на поверхности Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления слитый белок DDpp специфически связывает CD3. В других вариантах осуществления слитый белок DDpp специфически связывает CD2. В дополнительном варианте осуществления слитый белок DDpp специфически связывает рецептор Т-клеток (TCR). Согласно дополнительным вариантам осуществления слитый белок DDpp специфически связывает мишень на поверхности естественной клетки-киллера. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp специфически связывается с рецептором NKG2D (Natural Killer Group 2D). В дополнительных вариантах осуществления слитый белок DDpp специфически связывает CD16 (то есть Fc гамма RIII), CD64 (то есть Fc гамма RI) или CD32 (то есть Fc гамма RII).

[0408] В одном варианте слитый белок DDpp связывает мишень на лейкоците и опухолевый антиген на опухолевой клетке. В некоторых вариантах осуществления слитый белок DDpp связывает NKG2D. В дополнительном варианте осуществления слитый белок DDpp связывает NKG2D и мишень, выбранную из ErbB2, EGFR, IGF1R, CD19, CD20, CD80 и EPCAM. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp связывает CD3. В

конкретных вариантах осуществления DDpp специфически связывает CD3 эпислон. В одном варианте осуществления слитый белок DDpp связывает CD4.

Конъюгаты DDpp-лекарственное средство

[0409] В дополнительном варианте осуществления слитый белок DDpp может быть связан с другими органическими или неорганическими молекулами или субстратами путем использования химического конъюгирования. В одном варианте осуществления конъюгаты DDpp-лекарственное средство предназначены для облегчения локальной доставки цитотоксических агентов посредством направленной специфичности DDpp. Эта комбинация специфичности в отношении нацеливания и цитотоксического агента позволяет осуществлять целевую доставку лекарственного средства в опухоли и внутриклеточное накопление в них, когда системное введение этих неконъюгированных лекарственных средств может привести к неприемлемым уровням токсичности для нормальных клеток, а также для опухолевых клеток, которые должны быть элиминированы (Baldwin et al., Lancet pages 603-605 (1986); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic agents In Cancer Therapy: A Review," в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al., (ed.s), pp. 475-506 (1985)).

[0410] Цитотоксические агенты включают химиотерапевтические агенты, агенты, ингибирующие рост, токсины (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или их фрагменты), радиоактивные изотопы (т.е. радиоконъюгаты) и т.д. Химиотерапевтические агенты, пригодные в создании таких иммуноконъюгатов включает, например, метотрексат, адриамицин, доксорубин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубин или другие интеркалирующие агенты. Химиотерапевтические агенты, применимые для получения таких иммуноконъюгатов, также включают антитубулиновые лекарственные средства, такие как ауристатин, включая монометилауристатин Е (ММАЕ) и монометилауристатин F (ММАF). Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно применять согласно раскрытым способам, включают цепь А дифтерии, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина, цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Sarcocolla officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

[0411] В одном варианте осуществления DDpp (например, слитый белок DDpp) конъюгирован с радиоизотопом. В дополнительном варианте осуществления DDpp конъюгирован с изотопом, выбранным из ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga ,

^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re и ^{188}Re с использованием кого-либо из ряда известных хелаторов или путем прямого мечения. В других вариантах осуществления DDpp связан с лекарственными средствами, пролекарствами или лимфокинами, такими как интерферон. Конъюгаты DDpp и цитотоксина обычно могут быть получены с использованием различных бифункциональных белковых связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридиидитиол) пропионат (SPDP), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметил), адипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис (п-азидобензоил) гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис- (п-диазо-диазо) ниумбензоил) этилендиамин), диизоцианаты (такие как 2,6-диизоцианат толуола) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). В конкретном варианте осуществления токсин конъюгирован со слитым белком DDpp через расщепляемую ферментом линкерную систему (например, такую, которая присутствует в SGN-35). Также могут быть использованы конъюгаты DDpp и одного или более низкомолекулярных токсинов, таких как калихеамицин, майтансиноиды, трихотен и CC1065, и производные этих токсинов, которые обладают токсической активностью.

[0412] В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент ковалентно присоединен к DDpp с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер, присоединяющий DDpp и цитотоксический агент, расщепляется протеазой.

Терапевтическое применение в качестве клеточно-ассоциированного рецептора

[0413] В одном варианте осуществления раскрытые DDpp-CARs применяются для перенаправления трансдуцированных Т-клеток на опухолевую мишень, определяемую специфичностью связывания DDpp-CAR. В одном варианте осуществления первичные Т-клетки трансдуцируются лентивирусным вектором, кодирующим CAR, который комбинирует домен связывания мишени DD с трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом CD3-дзета, CD28, 41BB. Таким образом, полученная популяция трансдуцированных Т-клеток может вызывать опосредованный DDpp-CAR ответ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки генетически модифицированы для экспрессии DDpp-CAR, и Т-клетка DDpp-CAR вводят нуждающемуся в этом реципиенту. В других вариантах осуществления вводимая клетка способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. Особенно выгодные свойства DDpp-CAR включают одно, несколько или все из следующих преимуществ: (i) специфичность связывания с мишенью, (ii) повышенная терапевтическая эффективность, (iii) снижение побочных эффектов, не являющихся мишенями, (iv) возможность

настройки маркеров для конкретного пациента или популяции пациентов, (v) повышенная стабильность во время производства и обработки и (vi) способность нацеливаться на одну, две или более специфичных мишеней для усиления направленной на мишень терапии.

[0414] «Генетически модифицированные клетки», «перенаправленные клетки», «генно-инженерные клетки» или «модифицированные клетки», используемые в данном документе, относятся к клеткам, которые экспрессируют DDpp, предложенный в данном документе. В конкретном варианте осуществления генетически модифицированные клетки экспрессируют слитый белок DDpp, такой как DDpp-CAR. В дополнительном варианте осуществления генетически модифицированные клетки экспрессируют и презентуют DDpp-CAR на клеточной поверхности.

[0415] Термин «заболевание, на которое нацелены генетически модифицированные клетки», в контексте данного документе, охватывает нацеливание на любую клетку, вовлеченную любым образом в любое заболевание, генетически модифицированными клетками, независимо от того, нацелены ли генетически модифицированные клетки на пораженные клетки или здоровые клетки для достижения терапевтически полезного результата. Генетически модифицированные клетки включают, без ограничения, генетически модифицированные Т-клетки, НК-клетки, гемопоэтические стволовые клетки, плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки или эмбриональные стволовые клетки. Генетически модифицированные клетки экспрессируют DDpp-CAR, который может нацеливаться на любой из антигенов, экспрессируемых на поверхности клеток-мишеней.

[0416] В одном варианте осуществления часть DDpp в DDpp-CAR предназначена для лечения конкретного рака. Рак, который можно лечить, включает опухоли, которые не являются васкуляризованными или еще по существу не васкуляризованными, а также васкуляризованные опухоли. Рак может включать несолидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкозы и лимфомы) или может содержать солидные опухоли. Типы раковых заболеваний, подлежащих лечению с помощью DDpp-CAR, включают, без ограничения, карциному, бластому и саркому, а также некоторые лейкозные или лимфоидные злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли и злокачественные новообразования, например саркомы, карциномы и меланомы. Также включены опухоли/раковые заболевания взрослых и опухоли/раковые заболевания детей.

[0417] Примеры гематологических (или гематогенных) раковых заболеваний включают лейкозы, включая острые лейкозы (такие как острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобласты,

промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз), хронические лейкозы (такие как хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (индолентные формы и формы высокой степени злокачественности), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелой цепи, миелодиспластический синдром, волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазию.

[0418] Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают фибросаркому, микросаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, рак толстой кишки, лимфоидную злокачественную опухоль, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточный рак, базально-клеточный рак, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитомальную карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, рак желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, семиному, рак мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (например, глиома ствола головного мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома) астроцитома, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, краниофарингиома Шваннома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, акустическая неврома, олигодендроглиома, менангиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головной мозг).

[0419] В одном варианте осуществления раковые заболевания и расстройства можно лечить с использованием клеток, экспрессирующих DDpp-CAR, которые нацелены на BCMA, CD123, CS1, HER2, AFP или p26 AFP. В одном конкретном варианте осуществления DD-CAR может быть предназначен для нацеливания на CD22 для лечения В-клеточной лимфомы. В другом варианте осуществления клетка, экспрессирующая DDpp-CAR, содержит DDpp, предназначенный для нацеливания на CD19, может использоваться для лечения раковых заболеваний и расстройств, включая, без ограничения, пре-В ОЛЛ (педиатрическое показание), ОЛЛ у взрослых, лимфому из мантийных клеток, диффузную крупную В-крупноклеточную лимфому, терапию спасения после аллогенной трансплантации костного мозга и тому подобное. В другом варианте осуществления клетка, экспрессирующая DDpp-CAR, содержит DDpp, предназначенный

для нацеливания на CS1, и может использоваться для лечения множественной миеломы. В другом варианте осуществления клетка, экспрессирующая DDpp-CAR, содержит DDpp, предназначенный для нацеливания на BCMA, и может использоваться для лечения множественной миеломы. В другом варианте осуществления клетка, экспрессирующая DDpp-CAR, содержит DDpp, предназначенный для нацеливания на CS1 и предназначенный для нацеливания на BCMA, и может использоваться для лечения множественной миеломы. В другом варианте осуществления клетка, экспрессирующая DDpp-CAR, содержит DDpp, предназначенный для нацеливания на HER2, и может использоваться для лечения рака молочной железы или рака яичника.

[0420] «Связанные с В-клетками заболевания» в контексте данного описания включают иммунодефициты В-клеток, аутоиммунные заболевания и/или чрезмерную/неконтролируемую пролиферацию клеток, связанную с В-клетками (включая лимфомы и/или лейкозы). Примеры таких заболеваний, в которых DDpp-CAR могут использоваться для терапевтических подходов, включают, без ограничения: системная красная волчанка (СКВ), диабет, ревматоидный артрит (РА), реактивный артрит, рассеянный склероз (РС), пузырчатку обыкновенную, целиакию, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, X-сцепленную агаммаглобулинемию, пре-В острый лимфобластный лейкоз, системную красную волчанку, общий переменный иммунодефицит, хронический лимфолейкоз, заболевания, связанные с селективным дефицитом IgA и/или дефицит подкласса IgG, лимфомы линии В (лимфома Ходжкина и/или неходжкинская лимфома), иммунодефицит с тимомой, преходящая гипогаммаглобулинемия и/или синдром гипер-IgM, а также вирусно-опосредованные В-клеточные заболевания, такие как лимфопролиферативное заболевание, опосредованное EBV, и хронические инфекции, в которых В-клетки участвуют в патофизиологии.

[0421] В предпочтительном варианте осуществления DDpp-CAR экспрессируется в Т-клетке и обеспечивает способ лечения или профилактики рака, включающий введение клеток-хозяев, экспрессирующих DDpp-CAR, пациентам с раком, у которых раковая клетка экспрессирует опухолевый антиген на своей поверхности, и где DDpp специфически связывает антиген-мишень. Иллюстративные антигены-мишени, которые связывают DDpp и DDpp-CAR, включают, без ограничения, BCMA, CS1, HER2 и CD123.

[0422] Модифицированные DDpp-CAR-Т-клетки также могут служить типом вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* у млекопитающего. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека.

[0423] Клетки, экспрессирующие модифицированные DDpp-CAR-Т-клетки,

предложенные в данном документе, можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как химиотерапевтические средства, антитела, цитокины или популяции клеток. Композиции, предложенные в данном документе, предпочтительно составлены для внутривенного введения, которое можно вводить один или более раз.

[0424] Используемые в данном документе «варианты избежания потери антигена» относятся к клеткам, которые демонстрируют снижение или потерю экспрессии антигена-мишени, антигены которых представляют собой мишени для CAR, предложенных в данном документе.

[0425] Различные варианты осуществления изобретения далее будут проиллюстрированы посредством описания экспериментов, приведенных в соответствии с ним. Следующие примеры приведены для облегчения повторения раскрытых вариантов осуществления и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом остальную часть описания. В примерах ссылка делается на приложенные фигуры.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Выделение и характеристика DDpp, которые связывают иллюстративные представляющие интерес мишени

[0426] Библиотеку DDpp, полученную как описано в Intl. Appl. Publ. № WO2016164305 и WO 2016164369, скринировали на фаг связывание ВСМА, CD123, AFP и AFP p26 посредством нескольких раундов отбора. Содержание каждой из Intl. Appl. Publ. № WO2016164305 и WO 2016164369, полностью включено в данное описание посредством ссылки).

[0427] Отдельные колонии, содержащие фагмиду из результатов пэннинга ВСМА, отбирали и фаг извлекали в 96-луночном формате с использованием вспомогательного фага VCSM13 в соответствии со стандартными протоколами. Для анализа связывания мишени с помощью ИФА 96-луночные планшеты покрывали 1,3 мкг/мл козьего антитела против человеческого IgG1-Fc с последующей инкубацией с 5 нМ рекомбинантной мишени человека (ВСМА-Fc, CD123-Fc, AFP или AFP123) или IgG1-Fc. Затем в каждую лунку добавляли 50 мкл спасенного фага, разведенного в 5 раз в блокирующем буфере для ИФА. Связывание обнаруживали с использованием конъюгированного с HRP антитела против M13, и отношение ИФА для каждой последовательности определяли как поглощение при 450 нм для мишени (то есть ВСМА-Fc, CD123-Fc, AFP или AFP123), деленное на коэффициент поглощения для IgG1-Fc усредненное по всем проверенным лункам, содержащим этот клон.

Пример 2. Слитый белок DDpps

[0428] Чтобы оценить модульную природу DDpp в качестве связывающего элемента, связывающее вещество CD137 DDpp - bb10 (SEQ ID NO: 876), было переформатировано как слитое либо с N-, либо с C-концом тяжелой цепи антитела, полученного из последовательности RSV-специфического моноклонального антитела паливизумаб (SYNAGIS®). Биспецифические антитела, SYN-bb10 и bb10-SYN, проявляют связывание как с CD137, так и с RSV (Фиг. 1A-1B; заштрихованные квадраты - bb10-SYN, заштрихованные кружки - SYN-bb10)), демонстрируя, что новая последовательность связывания была передана родительской последовательности D-домена, и функциональность DDpp сохраняется как при слиянии на N-, так и на C-конце. Напротив, слияния между альфа-спиральным белковым каркасом без мишени (SEQ ID NO: 1) и SYN (DD-SYN для N-концевого слияния - незакрашенные кружки; SYN-DD для C-концевого слияния (незакрашенные квадраты) показал связывание только с RSV, но не связывание с CD137.

[0429] Связывание DDpp, bb10 с CD137, непосредственно связанным с пластиком, было продемонстрировано с помощью ИФА (Фиг. 1A-1B). Связывание DDpp bb10 с CD137 в качестве части клеточной мембраны также наблюдалось *in situ* с использованием FACS (данные не показаны).

Пример 3. DDpp-CAR, экспрессируемые в Т-клетках человека, продуцируют цитокины при связывании с мишенью

[0430] Способность мишени: Взаимодействие DD-CAR-экспрессирующих Т-клеток с мишенью индукции секреции цитокинов оценивали при помощи 293Т-клеток, которые временно трансфицировали 293Т-клетки с помощью лентивирусных упаковочных векторов 3-го поколения (pRSV-REV, pMDLg/pRRE, and pMD2.G) с кодированием векторов PELNS DDpp-CAR с помощью LIPOFECTAMINE® 3000. Через шесть часов после трансфекции среду меняли, затем собирали среду, содержащую лентивирус, через 30 и 54 часа после трансфекции, объединяли, затем центрифугировали для удаления клеточного дебриса. Затем лентивирус аликвотировали и хранили при -80 °C до использования для вирусной трансдукции. Трансдукцию Т-клеток человека лентивирусом CAR осуществляли с использованием полных PBMC человека, активированных гранулами активации CD3/CD28 Т-клеток в культуральной среде, дополненной 40 ед/мл IL2. Через 24 часа 2×10^6 PBMC высевали на лунку в 6-луночный планшет для тканевых культур с 1 мл культуральной среды и 3 мл среды, содержащей лентивирус, с добавлением 40 ед/мл IL2 и протамин сульфата. Затем планшеты центрифугировали в течение 2 часов при $1000 \times g$ при 32 °C, а затем инкубировали в

течение ночи при 37 °С. На следующие сутки процедуру лентивирусной трансдукции повторяли со свежими культуральными средами и содержащими лентивирус. Через 72 часа после начальной активации клеток шарики активации Т-клеток удаляли, затем Т-клетки культивировали для размножения при $\sim 0,25-0,5 \times 10^6$ Т-клеток/мл в свежей среде, дополненной 100 ед/мл ИЛ2. Каждые 2-3 суток Т-клетки подпитывали дополнительными средами Т-клеток и ИЛ2 до тех пор, пока их не использовали для анализов цитокинов (описанных ниже) через 7-10 суток после начальной активации.

[0431] Продукцию цитокинов в ответ на экспрессию антигена-мишени (CD123) оценивали путем культивирования 25000 трансдуцированных Т-клеток (7 суток после активации) с 25000 без мишеней (K562, CD123⁻) или с мишенью (BDCM, CD123⁺) опухолевых клеток на лунку в 96 луночные планшеты. Через 24 часа культуральные супернатанты собирали и продукцию цитокинов оценивали с помощью ИФА. Культуральные супернатанты разбавляли 1: 5 до ИФА. Таким же образом, продукцию цитокинов в ответ на экспрессию антигена-мишени PDL1 оценивали путем культивирования 25000 трансдуцированных Т-клеток (7 -суток после активации) с 25000 без мишеней (K562, PDL1⁻) или с мишенью (SUDHL1, PDL1⁺) опухолевых клеток на лунку в 96 луночные планшеты. Через 24 часа культуральные супернатанты собирали и продукцию цитокинов оценивали с помощью ИФА. Культуральные супернатанты разбавляли 1: 5 до ИФА.

[0432] На Фиг. 2А и Фиг. 2В показано, что Т-клетки, экспрессирующие CD123-связывающие DDpp-CAR, продуцируют гамма-интерферон (IFN γ) после стимуляции клетками CD123⁺ BDCM, но не клеточной линией CD123⁻ K562. На Фиг. 2С и Фиг. 2D показано, что Т-клетки, экспрессирующие CD123-связывающие DDpp-CAR, продуцируют интерлейкин 2 (ИЛ2) после стимуляции клетками CD123⁺ BDCM, но не клеточной линией CD123⁻ K562. Аналогично, на Фиг. 2Е и 2F показано, что Т-клетки, экспрессирующие PDL1-связывающие DDpp-CAR, продуцируют гамма-интерферон (IFN γ) и ИЛ2, соответственно, после стимуляции клетками PDL1⁺ SUDHL1, но не клеточной линией PDL1⁻ K562.

Пример 4. Т-клетки, трансдуцированные DDpp-CAR, не проявляют фенотипов, связанных с истощением Т-клеток

[0433] Для оценки потенциального антиген-независимого истощения в Т-клетках, экспрессирующих DDpp-CAR, трансдуцированные Т-клетки (10-е сутки после активации) окрашивали антителами против CD3 и маркерами истощения Т-клеток (LAG3, PD1 и TIM3). На Фиг. 3А обобщены данные отдельных экспериментов с несколькими донорами Т-клеток. Данные демонстрируют, что экспрессия маркеров истощения не была повышена

в CD123-связывающих Т-клетках DDpp-CAR по сравнению с тем, что наблюдалась с анти-CD123 CAR, содержащим scFv (32176). На Фиг. 3В показаны репрезентативные данные проточной цитометрии экспрессии LAG3, PD1 и TIM3 в Т-клетках, трансдуцированных либо scFv-содержащим CAR (верхний ряд), либо DDpp-CAR (в этом конкретном эксперименте CD123, нацеленный на cg06) через 10 суток после первоначальной активации Т-клетки. Сходство этих данных снова демонстрирует, что Т-клетки DDpp-CAR не регулируют экспрессию маркеров истощения, что дополнительно подтверждает их эффективность при иммунотерапии рака.

Пример 5. Экспрессирующие DDpp-CAR Т-клетки демонстрируют мишень-специфичную дегрануляцию и цитотоксичность опухоли

[0434] Для оценки дегрануляции Т-клеток, экспрессирующих DDpp-CAR, 1×10^5 трансдуцированных Т-клеток (9 сутки после активации) культивировали в Т-клеточной среде в течение 4 часов в присутствии монензина и PE-конъюгированного CD107a/LAMP1. Т-клетки культивировали отдельно (Фиг. 4А) или в присутствии 2×10^5 опухолевых клеток без мишени (K562, которые представляют собой CD123⁻, Фиг. 4В или экспрессирующих мишень опухолевых клеток (BDCM, CD123⁺, Фиг. 4С), затем промывали и окрашивали в отношении экспрессии CD3. Дегрануляцию Т-клеток затем оценивали при помощи проточной цитометрии, сначала вводя клетки CD3 + SSC-low (неопухолевые), затем клетки CD3 + CD107a +. Символы представляют образцы из отдельных экспериментов с использованием нескольких доноров.

[0435] Продукция CD107a (маркер дегрануляции Т-клеток DDpp-CAR) была эквивалентна отрицательному контролю, когда нацеленные на CD123 Т-клетки DDpp-CAR культивировали отдельно. Ограниченная экспрессия CD107a при совместном культивировании Т-клеток DDpp-CAR с CD123-негативными опухолевыми клетками K562 и значительная экспрессия CD107a наблюдалась, когда Т-клетки DDpp-CAR, нацеленные на CD123, совместно культивировались с CD123-положительными клетками BDCM (данные не представлены). Эти данные показывают, что Т-клетки активируются, подвергаются передаче сигналов, подвергаются дегрануляции и приводят к эрадикации опухоли. Эти данные также обеспечивают дополнительную поддержку для мишень-зависимой активации экспрессирующих DDpp-CAR Т-клеток.

[0436] Цитолитическую активность DDpp-CAR Т-клеток оценивали с использованием Т-клеток, полученных от двух независимых доноров. Донор № 1 (Фиг. 5А-5В) DDpp-CAR Т-клетки эффективно уничтожают опухоль, экспрессирующую CD123, BDCM, но проявляют очень небольшую цитолитическую активность в отношении CD123-отрицательной опухоли, K562. Аналогичные результаты наблюдались у донора № 2 (Фиг.

5C и 5D).

Пример 6. Биспецифичный DDpp

[0437] Как обсуждалось выше, DDpp может быть одновалентным или многовалентным и/или мультиспецифичным. Чтобы оценить способность мультиспецифичных Т-клеток DDppCAR вызывать иммунный ответ, на клетках Jurkat экспрессировали биспецифичные DDpp-CAR и измеряли внутриклеточную передачу сигналов в ответ на опухолевые клетки, экспрессирующие одну или обе мишени. Были сконструированы две биспецифичные DDppCAR, которые различались по порядку слияния доменов связывания. CG06-pb04 имеет домен pb04, слитый с трансмембранной областью CD8a, в то время как pb04-cg06 имеет домен cg06, слитый с трансмембранной областью CD8a. Обе конструкции использовали GS-линкер между доменами, связывания мишени.

[0438] На Фиг. 6A показано, что DDpp-CAR, содержащие только cg06, только pb04 (Фиг. 6B), cg06-pb04, (Фиг. 5C) и pb04-cg06 (Фиг. 5D) могут быть трансдуцированы и экспрессированы в репортерной клеточной линии Jurkat NFAT, что оценивается по связыванию mAb против FLAG с CAR. Способность моноспецифичных и биспецифичных CAR активировать путь NFAT оценивали путем совместного культивирования различных CAR с опухолевыми клетками с различным уровнем экспрессии CD123 и/или PDL1. Клетки совместно культивировали с клетками-мишенями в течение 6 часов. Опосредованную NFAT передачу сигналов измеряли путем добавления к клеткам реагента для анализа люциферазы (Promega) и количественного определения относительных единиц люминесценции (RLU) в качестве меры индуцированной внутриклеточной передачи сигналов.

[0439] На Фиг. 6E изображены результаты этого эксперимента. Крайняя левая группа столбцов и гистограмма показывают относительный эффект уничтожения DDG cg06 против различных типов клеток. Сигнальный ответ после совместного культивирования с высоким количеством CD123 + BDCM был самым большим с этим DDpp-CAR. Следующая группа справа показывает данные, показывающие внутриклеточную передачу сигналов после совместного культивирования DDp pb04 против тех же типов клеток. Передача сигнала была самой высокой в BDCM, за которой следуют SUHDL1 и H460 (это линии клеток с самой высокой экспрессией для CD123 и PDL1 (данные не показаны)). Следующая группа справа изображает данные, показывающие внутриклеточную передачу сигналов би-специфического cd06-pb04 DDpp (cg06 более дистальный по отношению к мембране Т-клеток по сравнению с pb04). Наконец, самая правая группа показывает внутриклеточную передачу сигналов от второго

биспецифичного DBPpp (pb04-cg06 DDpp, где pb04 является более дистальным по отношению к мембране Т-клеток по сравнению с cg06). Эти две группы указывают на то, что биспецифичные DDpp-CAR действительно способствуют внутриклеточной передаче сигналов. В соответствии с вариантами осуществления, двухспецифичные DDpp-CAR проявляют повышенную активность (величина внутриклеточной передачи сигналов в группе pb04-cg06 с клетками BDCM больше, чем может быть объяснено только одним DDpp pb04). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления DDpp-CAR, содержащие два DDpp, могут взаимодействовать для улучшения функции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления существует синергизм между различными DDpp, используемыми в биспецифичном (или другом мультимерном) DDpp-CAR.

Пример 7. Применение двойных адаптеров связывающих доменов для улучшения передачи сигнала CAR

[0440] 50000 репортерных клеток, ранее трансдуцированных связывающим AFP (домен p26) CAR (af03) (SEQ ID NO: 961) культивировали в течение 5 часов в присутствии CD123-специфичного Cg06-адаптера (Cg06-p26, SEQ ID NO: 953) или Cg06-двойного адаптерного белка (Cg06-p26-Cg06, SEQ ID NO: 956) в присутствии 50000 CD123⁺ MOLM13 или CD123-дефицитных клеток MOLM13, затем оценивали на активность люциферазы. CD123-дефицитные клетки создавали с использованием технологии генной инженерии CRISPR/Cas9 (Фиг. 7А). Аналогичным образом, 50000 репортерных клеток, ранее трансдуцированных связывающим AFP (домен p26) CAR (af03) (SEQ ID NO: 961) культивировали в течение 5 часов в присутствии ВСМА-специфичного Bc40-адаптера (Bc40-p26, SEQ ID NO: 954) или Bc40-двойного адаптерного белка (Bc40-p26-Bc40, SEQ ID NO: 957) в присутствии или отсутствии 50000 ВСМА⁺ U266 клеток, затем оценивали на активность люциферазы (Фиг. 7В).

[0441] На Фиг. 7А и 7В показано, что белки адаптеров с двумя доменами связывания (бивалентные) управляют усилением сигналинга клетками Jurkat, экспрессирующих CAR, по сравнению с единичными адаптерами связывающих доменов.

Пример 8. DDpp-опосредованная опухолевая иммунотерапия *in vivo*

[0442] Для оценки противоопухолевой активности *in vivo* DDpp CAR Т-клетки трансдуцировали с помощью bc40 DDpp CAR (CAR, нацеленный на ВСМА). Bc40 представляет собой SEQ ID NO: 164. Трансдуцированные клетки (5X10E6) вводили мышам NSG внутривенно через 34 суток после того, как мыши получали 10E7 клеток, экспрессирующих ВСМА, меченных люциферазой/gfp опухолевых клеток U226. Как показано на Фиг. 8, четыре мыши получили опухоль U226 на 0 сутки, которая прогрессивно росла в течение 32 суток. На 34 сутки мыши № 1, № 2 и № 4 получали Т-

клетки CAR bc40-DDpp. Мышь № 3 не получила Т-клеток. На 45 сутки опухоль U226 была очищена у мышей, получавших Т-клетки CAR, в то время как мышь, которая не получала Т-клетки, умерла от опухолевой нагрузки.

[0443] Все цитируемые публикации, патенты, заявки на патенты, интернет-сайты и номера доступа/последовательности баз данных (включая как полинуклеотидные, так и полипептидные последовательности) включены в данное описание в качестве ссылки в полном объеме для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент, интернет-сайт или номер доступа/последовательность базы данных были специально и индивидуально указаны для включения в качестве ссылки.

[0444] Предполагается, что различные комбинации или подкомбинации конкретных признаков и аспектов, раскрытых выше, могут быть выполнены и все еще подпадают под варианты осуществления, охватываемые описанием. Кроме того, раскрытие любого конкретного признака, аспекта, способа, свойства, характеристики, качества, атрибута, элемента или тому подобного в связи с вариантом осуществления может использоваться во всех других вариантах осуществления, изложенных в данном документе. Соответственно, следует понимать, что различные признаки и аспекты раскрытых вариантов осуществления могут сочетаться или заменять друг друга для формирования изменяющихся режимов раскрытых вариантов осуществления. Таким образом, предполагается, что объем вариантов осуществления, охватываемых данным описанием, не должен быть ограничен конкретными раскрытыми вариантами осуществления, описанными в данном документе. Кроме того, хотя охватываемые варианты осуществления восприимчивы к различным модификациям и альтернативным формам, их конкретные примеры были показаны на фигурах и подробно описаны в данном документе. Однако следует понимать, что объем изобретения не должен быть ограничен конкретными раскрытыми формами или способами, а наоборот, изобретение должно охватывать все модификации, эквиваленты и альтернативы, попадающие в сущность и объем различных описанных вариантов осуществления и прилагаемой формулы изобретения. Любые раскрытые в данном документе способы не обязательно должны выполняться в указанном порядке. Раскрытые в данном документе способы включают определенные действия, предпринимаемые практикующим врачом, тем не менее, они могут также включать любые сторонние инструкции этих действий, прямо или косвенно. Например, такие действия, как «введение Т-клетки, содержащей DDpp-CAR», включают «инструктаж по введению Т-клетки, содержащей DDpp-CAR». Кроме того, если признаки или аспекты изобретения описаны в терминах групп Маркуша,

специалисты в данной области техники поймут, что изобретение также таким образом описано в терминах любого отдельного члена или подгруппы членов группы Маркуша.

[0445] Раскрытые в данном документе диапазоны также охватывают любые и все перекрытия, поддиапазоны и их комбинации. Термины, такие как «до», «по меньшей мере», «больше чем», «менее чем», «между» и т.п., включает указанное число. Числа, которым предшествует такой термин, как «около» или «приблизительно», включают перечисленные числа. Например, «около 10 нанометров» включает «10 нанометров».

ТАБЛИЦА 2: Дополнительное раскрытие последовательности:

SEQ ID:	Мишень	Последовательность
1	Домен D (без мишени)	MGSWAEFKQRLAAIKTRLQALGGSEAEELAAFEKEIAAFESELQA YKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN
2	Эпитоп ГКГС	LAAIKTRLQ
3	CD19	LEKCFQ TENPLECQDKGEEELQKYIQESQALAKRSCGLFQKLGE YYLQNAFLVAYTKKAPQLTSELMAITRKMAATAATCCQLSED KLLACGEGAADIIHGLCIRHEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCF SSLVVDETYVPPAFSDDKFIFHKDLCQAQGV ALQTMKQEFLINL VKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCF AEEGQKLIS KTRAALGV
4	GlySer	GGGGTGGGGS
5	GlySer	GGGGDGGGGS
6	a3D (Q19E) Без мишени	MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAEELAAFEKEIAAFESELQA YKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN
7	ECD BCMA	MLQMAGQCSQNEYFDSL LHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNAS VTNSVKGTNA
8	ECD CD123	TKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYSMP AVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWA GAENLTCWIHDVDFLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQ QYECLHYKTD AQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILVRGRSAAF GIPCTDKFVVFVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYE FLSAWSTPQRFEC DQEEGANTRAWR

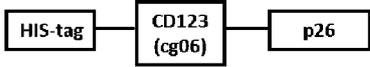
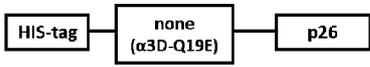
9	AFP	RTLHRNEYGIASILDSYQCTAEISLADLATIFFAQFVQEATYKEVS KMKDALTAIEKPTGDEQSSGLENQLPAFLEELCHEKEILEKY GHSDCCSQSEEGRHNCFLAHKKPTPASIPLFQVPEPVTSCAYEE DRETFMNKFIYEIARRHPFLYAPTILLWAARYDKIIPSCCKAENA VECFQTKAATVTKELRESSLLNQHACAVMKNFGTRTFQAITVT KLSQKFTKVNFTIQLVLDVAHVHEHCCRGDVLDCLDQDGEKI MSYICSQQDTLSNKITECCKLTTLERGQCIIHAENDEKPEGLSPNL NRFLGDRDFNQFSSGEKNIFLASFVHEYSRRHPQLAVSVILRVAK GYQELLEKCFQTENPLECQDKGEEELQKYIQESQALAKRSCGLF QKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSSELMAITRKMAATAATCC QLSEDKLLACGEGAADIIIGHLCIRHEMTPVNPVGVGQCCTSSYAN RRPCFSSLVVDETYVPPAFSDDKFIFHKDLCQAQGVALQTMKQE FLINLVKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEG QKLISKTRALGV
10	AFP p26	LEKCFQTENPLECQDKGEEELQKYIQESQALAKRSCGLFQKLGE YYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSSELMAITRKMAATAATCCQLSED KLLACGEGAADIIIGHLCIRHEMTPVNPVGVGQCCTSSYANRRPCF SSLVVDETYVPPAFSDDKFIFHKDLCQAQGVALQTMKQEFLINL VKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGQKLIS KTRALGV
968	P26Q217P	LEKCFQTENPLECQDKGEEELQKYIQESQALAKRSCGLFQKLGE YYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSSELMAITRKMAATAATCCQLSED KLLACGEGAADIIIGHLCIRHEMTPVNPVGVGQCCTSSYANRRPCF SSLVVDETYVPPAFSDDKFIFHKDLCQAQGVALQTMKQEFLINL VKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCFAEEGPKLIS KTRALGV
969	P26 (Q26- V229)	QESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSSEM AITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIGHLCIRHEMTPV NPGVGVGQCCTSSYANRRPCFSSLVVDETYVPPAFSDDKFIFHKDL CQAQGVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLEK CCQGQEQEVCFAEEGQKLISKTRALGV
970	P26(Q26- V229) Q217P	QESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSSEM AITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIGHLCIRHEMTPV NPGVGVGQCCTSSYANRRPCFSSLVVDETYVPPAFSDDKFIFHKDL CQAQGVALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLEK

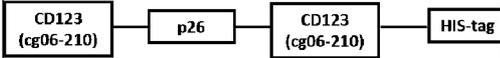
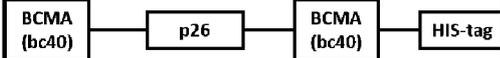
		CCQGQEQEVCF AEEGPKLISKTRAALGV
971	p26 (K23-V229)	KYIQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIIGHL CIRHEMTPVNPGVGQCCTSSYANRRPCFSSLV VDETYVPPAFSDDKFIFHKDL CQAQGV ALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCF AEEGQKLISKTRAALGV
972	p26(K23-V229) Q217P	KYIQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIIGHL CIRHEMTPVNPGVGQCCTSSYANRRPCFSSLV VDETYVPPAFSDDKFIFHKDL CQAQGV ALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCF AEEGPKLISKTRAALGV
973	p26 (G17-V229)	GEEELQKYIQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIIGHL CIRHEMTPVNPGVGQCCTSSYANRRPCFSSLV VDETYVPPAFSDDKFIFHKDL CQAQGV ALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCF AEEGQKLISKTRAALGV
974	p26(G17-V229) Q217P	GEEELQKYIQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIIIGHL CIRHEMTPVNPGVGQCCTSSYANRRPCFSSLV VDETYVPPAFSDDKFIFHKDL CQAQGV ALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEAVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCF AEEGPKLISKTRAALGV
963	Зрелый ECD CD22	DSSKWVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFHNPEY NKNTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQLGLRMESKTEKWMERIHLNVSERPFPPHIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSCYGYPIQLQWLLEGVPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFS PQW SHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKHTPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLREVT KDQSGKYCCQVSNDVGPGRSEEVFLQVQY APEPSTVQILHSPA VEGSQVEFLCMSLANPLPTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWHAGTYSCVAENILGTGQRGPGAELDVQYPPKKVTTVIQNPMP IREGDTVTLSCNYNSSNPSVTRYEWKPHGAWEEPSLGVLKIQNVGWDNTTIACAACNSWCSWASPVALNVQYAPRDVVRKIKPLSEIHS GNSVSLQCDFSSSHPKVEVQFFWEKNGRLLGKESQLNFDSISPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLE

		VLYAPRRLRVSMSPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYTWFD WNNQSLPYHSQKLRLEPVKVQHSGAYWCQGTNSVGKGRSPLS TLTVYYSPETIGRR
965	Зрелый ECD CS1	SGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNTTPLVTIQPE GGTIIVTQNRNRERVDFPDGGYSLKLSKLLKKNDSGIYYVGIYSSS LQQPSTQEYVLHVYEHLSKPKVTMGLQSNKNGTCVTNLTCME HGEEDVIYTWKALGQAANESHNGSILPISWRWGESDMTFICVAR NPVSRNFSSPILARKLCEGAADDPDSSM
967	Зрелый ECD HER2	TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHL YQGCQVVQGNLELTYL PTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNVQRQVPLQRLRIVRGTQLFED NYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQRLSLTEILKGGVL IQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPM CKGSRWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARCKGPLPTDCCHEQCA AGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNP EGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCP LHNQEVT AEDGT QRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIF GSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWP DSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGAYS LTLQGLGISWLGLRSLREL GSG LALIHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDEC VGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRV LQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAH YKDPPFCVARCPSGVKPDL SYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHS CVDLDDKGC PAEQRASPLT

ТАБЛИЦА: 3 Иллюстративные адаптеры

SEQ ID NO:	Дизайн адаптера	Последовательность адаптера
951		DEMGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGSE AELAAFEKEIAAFESELQAYKKGKNPEV EKLREIAAVIRSNLQAYRHNGGGGGSGGG GSGGGGSGMLQMAGQCSQNEYFDSLH ACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNS VKGTNAGGGGGSGGGGGSGGGGSHHHHH HHHHH
952		DEGGGGSMGSWAEFKQRLAAIKTRLQA LGGSEAEELAAFEKEIAAFESELQAYKKG

		<p>GNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHNGG GGSGGGGSGGGGSGMLQMAGQCSQNE YFDSLLHACIPCQLRCSNTPPLTCQRYC NASVTNSVKGTNAGGGGSGGGGSGGGG SHHHHHHHHHH</p>
953		<p>DEHHHHHHHHHHKLENLYFQGGGGGS MGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGSEAE LAAFEKEIAAFESELQAYKGKGNPEVEK LREIAAVIRSNLQAYRHNGGGGSGGGGS GGGSLEKCFQTENPLECQDKGEEELQK YIQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAF LVAYTKKAPQLTSELMAITRKMAATA ATCCQLEDKLLACGEGAADIIHGLCIR HEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSL VVDETYVPPAFSDDKFIFHKDLCQAQGV ALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEAVI ADFSGLLEKCCQGQEQEVCF AEEGQKLI SKTRAALGV</p>
954		<p>DEHHHHHHHHHHKLENLYFQGGGGGS MGSWSEFWVRLGAIRERLDALGGSEAE LAAFEKEIAAFESELQAYKGKGNPEVEK LRYTAATIRRFLQAYRHNGGGGSGGGGS GGGSLEKCFQTENPLECQDKGEEELQK YIQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAF LVAYTKKAPQLTSELMAITRKMAATA ATCCQLEDKLLACGEGAADIIHGLCIR HEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSL VVDETYVPPAFSDDKFIFHKDLCQAQGV ALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEAVI ADFSGLLEKCCQGQEQEVCF AEEGQKLI SKTRAALGV</p>
955		<p>DEHHHHHHHHHHKLENLYFQGGGGGS MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAE AAFEKEIAAFESELQAYKGKGNPEVEAL RKEAAAIRDELQAYRHNGGGGSGGGGS</p>

		<p>GGGGSLEKCFQTENPLECQDKGEEELQK YIQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQNAF LVAYTKKAPQLTSELMAITRKMAATA ATCCQLEDKLLACGEGAADIIHGLCIR HEMTPVNPVGVCCTSSYANRRPCFSSL VVDETYVPPAFSDDKFIFHKDLCQAQGV ALQTMKQEFLINLVKQKPQITEEQLEAVI ADFSGLLEKCCQGQEQEVCF AEEGQKLI SKTRAALGV</p>
956	 <p>CD123 (cg06-210) — p26 — CD123 (cg06-210) — HIS-tag</p>	<p>DEGGGSMGSWDEFGRRLYAIEWQLYA LGGTEAELAAFEKEIAAFESELQAYK GK GNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGG GSGGGGSGGGGSGLEKCFQTENPLECQD KGEEELQKYIQESQALAKRSCGLFQKL G EYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSELMAIT RKMAATAATCCQLEDKLLACGEGAAD IIHGLCIRHEMTPVNPVGVCCTSSYAN RRPCFSSLVVDETYVPPAFSDDKFIFHKD LCQAQGVVALQTMKQEFLINLVKQKPQIT EEQLEAVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCF AEEGQKLISKTRAALGVGGGGGSGGGGS GGGSMGSWDEFGRRLYAIEWQLYALG GTEAELAAFEKEIAAFESELQAYK GKGN PEVEKLREIAAVIRENLQAYRHNGGGGS GGGGSGGGGSHHHHHHHHHHH</p>
957	 <p>BCMA (bc40) — p26 — BCMA (bc40) — HIS-tag</p>	<p>DEGGGSMGSWSEFWVRLGAIRERLDA LGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYK GK GNPEVEKLRYTAATIRRFLLQAYRHNGGG GSGGGGSGGGGSGLEKCFQTENPLECQD KGEEELQKYIQESQALAKRSCGLFQKL G EYYLQNAFLVAYTKKAPQLTSELMAIT RKMAATAATCCQLEDKLLACGEGAAD IIHGLCIRHEMTPVNPVGVCCTSSYAN RRPCFSSLVVDETYVPPAFSDDKFIFHKD LCQAQGVVALQTMKQEFLINLVKQKPQIT</p>

	EEQLEAVIADFSGLLEKCCQGQEQEVCF AEEGQKLISKTRAALGVGGGGSGGGGS GGGGSMGSWSEFWVRLGAIRERLDALG GSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKKGKN PEVEKLRYTAATIRRFLLQAYRHNGGGGS GGGGSGGGGSHHHHHHHHHH
--	--

ТАБЛИЦА: 4 Иллюстративные последовательности ADBD CAR

SEQ ID NO:	Дизайн CAR	Последовательность CAR
958	CTsp-Flag- GSлинкер- α 3D(Q19E)- GSлинкер-CD8H-TM-41BB-CD3 ζ	MAFLWLLSCWALLGTTFGDYKDDDD KGGGGSGGGGSMGSWAEFKQRLAAI KTRLEALGGSEAEAAFEKEIAAFESE LQAYKKGKNPEVEALRKEAAAIRDEL QAYRHNGQAGSGTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGD GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
959	CTsp-Flag- GSлинкер-cg06-GSлинкер- CD8H-TM-41BB-CD3 ζ	MAFLWLLSCWALLGTTFGDYKDDDD KGGGGSGGGGSMGSWDEFGRRLYAIE WRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESEL QAYKKGKNPEVEKLREIAAVIRSNLQA YRHNGGGGGSGGGSGTTTPAPRPPTP APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD

		VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR
960	CTsp-Flag- GSлинкер-bc40-GSлинкер- CD8H-TM-41BB-CD3ζ	MAFLWLLSCWALLGTTFGDYKDDDD KGGGGSGGGGSMGSWSEFWVRLGAI RERLDALGGSEAELAAFEKEIAAFESE LQAYKKGKNPEVEKLRYTAATIRFL QAYRHNGGGGSGGGGSGTTTTAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
961	CTsp-Flag- GSлинкер-af03-GSлинкер- CD8H-TM-41BB-CD3ζ	MAFLWLLSCWALLGTTFGDYKDDDD KGGGGSGGGGSMGSWFEFYDRLNAID ARLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESEL QAYKKGKNPEVENLRVHAAAIREWL QAYRHNGGGGSGGGGSGTTTTAPRPP TPAPTIASMGSWAEFKQRLAAIKTRLE ALGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRH NQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
962	CTsp-Flag- GSлинкер-af05-GSлинкер-	MAFLWLLSCWALLGTTFGDYKDDDD

	CD8H-TM-41BB-CD3ζ	KGGGGSGGGGSMGSWLEFYHRLNAID SRLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESEL QAYKGKGNPEVESLRDHA AHIREWLQ AYRHNGGGGSGGGGSGTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
--	-------------------	--

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, содержащий основанный на домене D (DD) мишень-связывающий домен, где DD мишень-связывающий домен специфически связывается с полипептидом AFP p26 и содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 895, где полипептид AFP p26 состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, 968, 969, 970, 971, 972, 973 или 974.

2. Белок по п.1, где DD мишень-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 895, содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 замен.

3. Белок по п.1, где DD мишень-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 749-761, 763-765 или 887-895.

4. Белок по п.1, где DD мишень-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 895, содержащую 0, 1, 2 или 3 замены.

5. Белок по п.1, где DD мишень-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 749, 750, 753-755, 765 или 887-895.

6. Белок по п.1, где DD мишень-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 895.

7. Белок по любому из пп.1-6, дополнительно содержащий второй полипептид, где второй полипептид напрямую или косвенно слит с DD мишень-связывающем доменом.

8. Белок по п.7, где второй полипептид содержит полноразмерное антитело или фрагмент антитела.

9. Белок по п.7, где DD мишень-связывающий домен слит с: amino концом тяжелой цепи полноразмерного антитела; amino концом легкой цепи полноразмерного антитела; карбоксильным концом тяжелой цепи полноразмерного антитела; или карбоксильным концом легкой цепи полноразмерного антитела.

10. Белок по п.7, где второй полипептид представляет собой Fc-домен.

11. Белок по любому из пп.1-10, который является меченым.

12. Белок по п.11, где метка выбрана из группы, состоящей из ферментативной метки, флуоресцентной метки, люминесцентной метки, биолюминесцентной метки и биотинового фрагмента.

13. Белок по любому из пп.1-11, который конъюгирован с терапевтическим или цитотоксическим агентом.

14. Химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит целевой мишень-связывающий домен, содержащий белок по любому из пп.1-6.

15. CAR по п.14, который содержит целевой мишень-связывающий домен,

трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

16. CAR по п.15, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD8, 41BB или CD28.

17. CAR по п.15 или 16, где внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из домена альфа-, бета- или дзета- цепи рецептора Т-клеток человека; домена 41BB человека; домена CD28 человека и любой их комбинации.

18. CAR по любому из пп.15-17, где внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD1, антигена, связанного с функцией лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, NKG2D, B7-H3, лиганда, который специфически связывается с CD83, и любой их комбинации.

19. Белок по любому из пп.1-13, который также содержит второй мишень-связывающий домен, имеющий ту же или другую мишень, что и DD мишень-связывающий домен.

20. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая белок по любому из пп.1-10 или 19 или CAR по любому из пп.14-18.

21. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.20.

22. Вектор по п.21, где нуклеиновая кислота функционально связана с нуклеотидной последовательностью, которая регулирует экспрессию белка, кодируемого нуклеиновой кислотой.

23. Вектор по п.22, который представляет собой лентивирусный вектор, где вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.

24. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.20 или вектор по любому из пп.21-23.

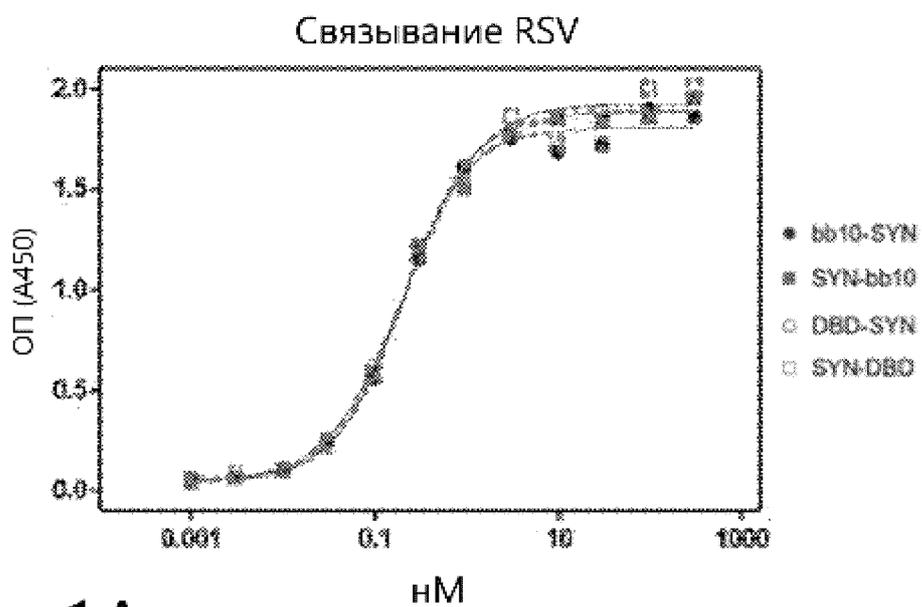
25. Клетка, сконструированная для экспрессии белка по любому из пп.1-10 или 19.

26. Клетка, сконструированная для экспрессии CAR по любому из пп.14-18.

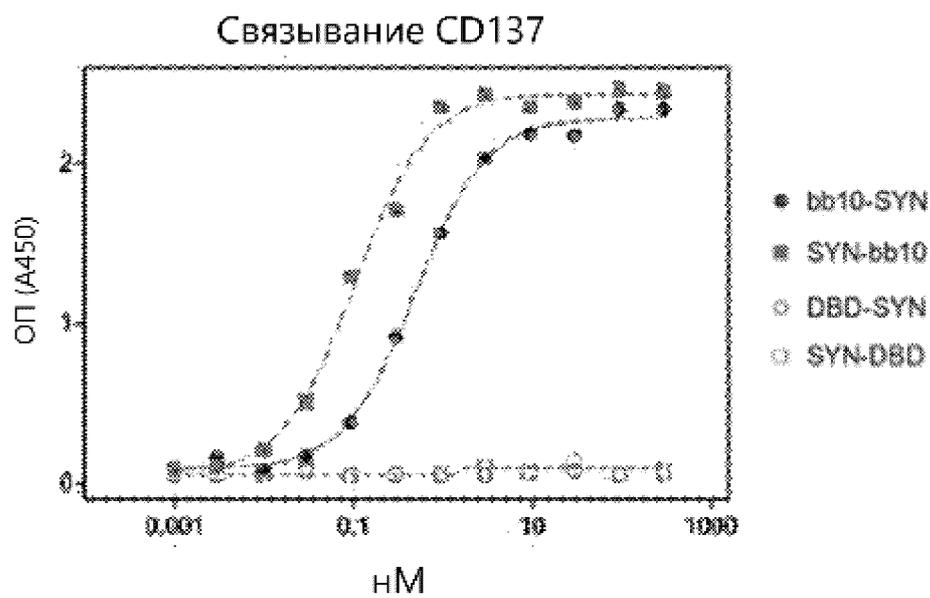
27. Клетка по п.26, где клетка представляет собой Т-клетку или естественную клетку-киллер (NK).

28. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из пп. 1-13 или 19, нуклеиновую кислоту по п. 20, вектор по любому из пп. 21-23 или клетку по п. 26 или 27.

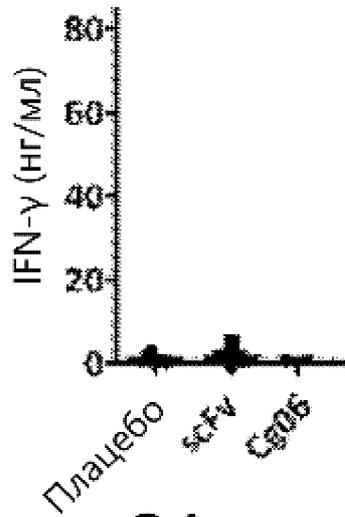
По доверенности



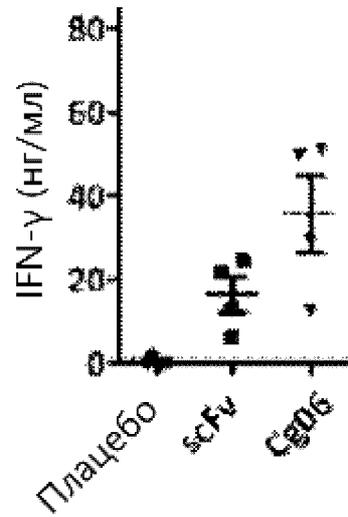
Фиг. 1А



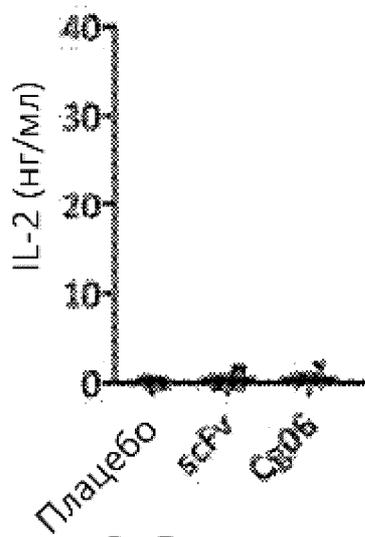
Фиг. 1В

K562 (CD123⁻)

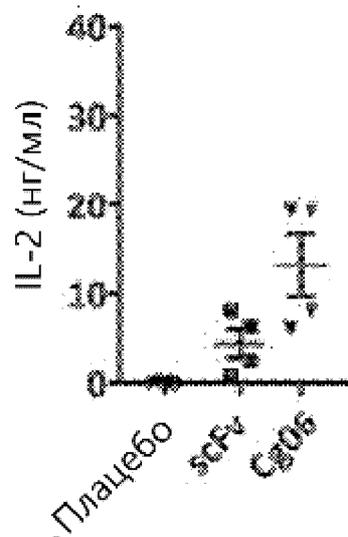
Фиг. 2А

BDCM (CD123⁺)

Фиг. 2В

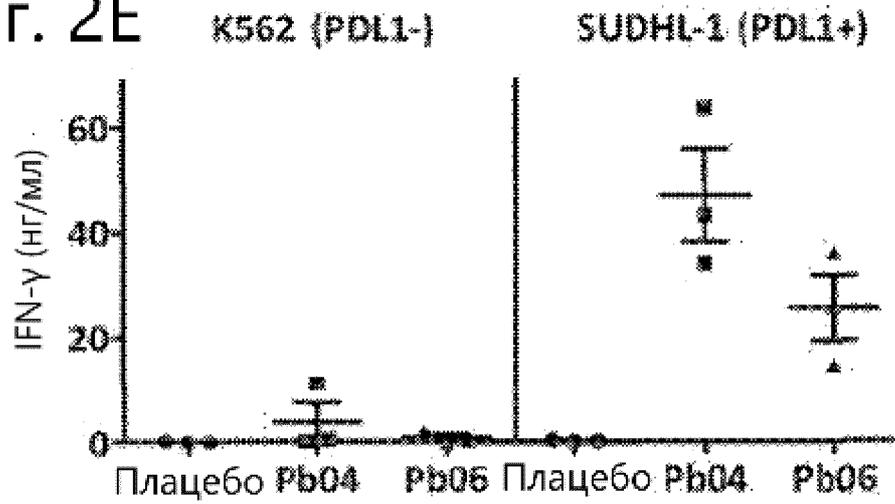
K562 (CD123⁻)

Фиг. 2С

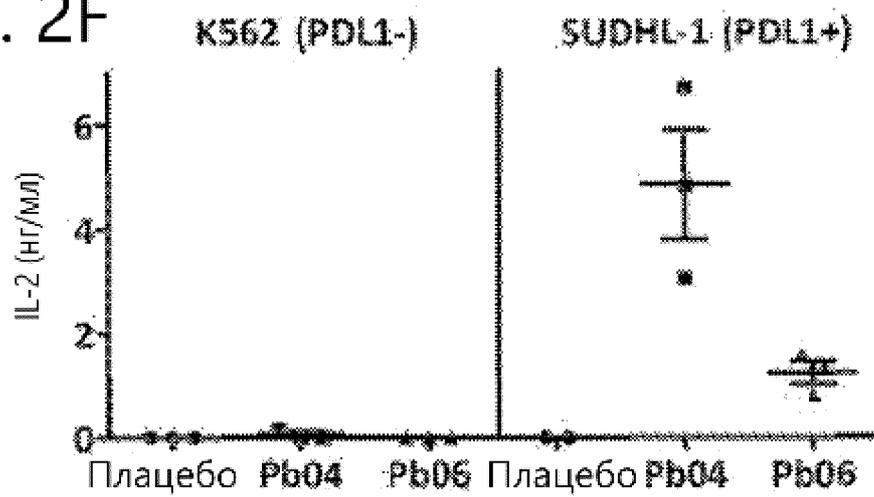
BDCM (CD123⁺)

Фиг. 2D

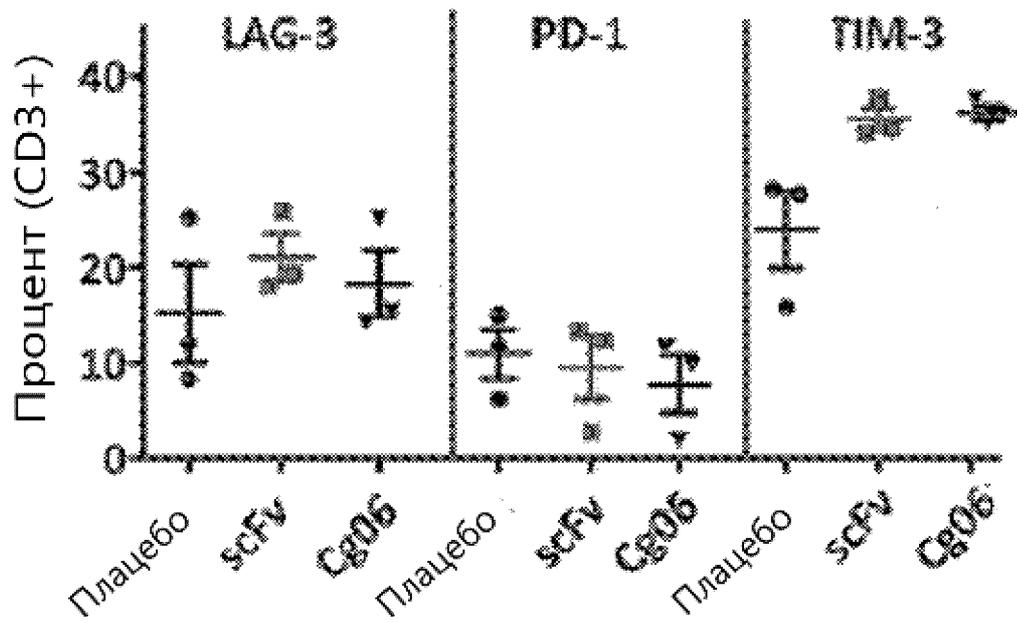
Фиг. 2Е



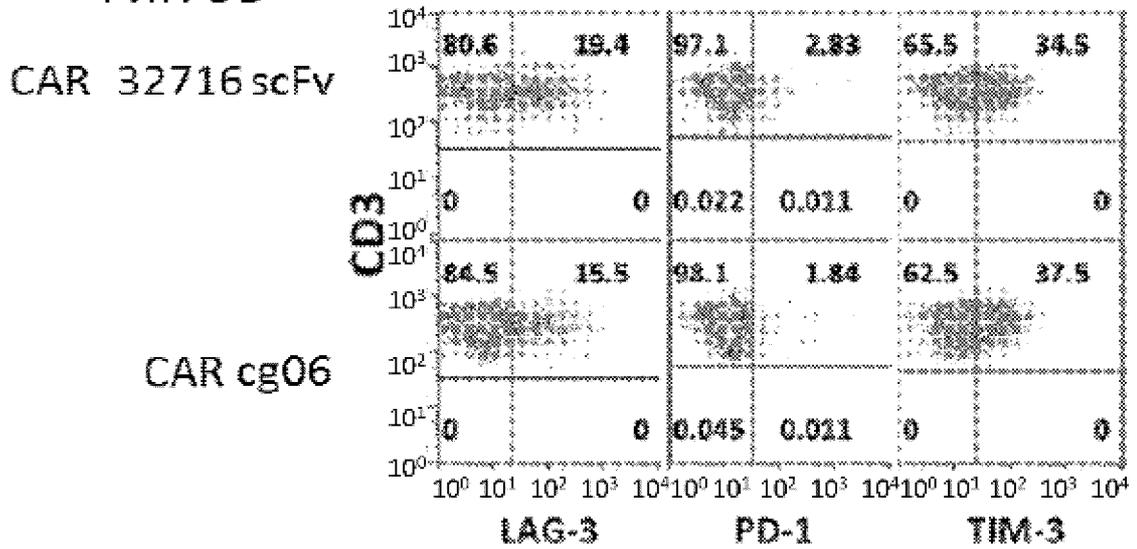
Фиг. 2F



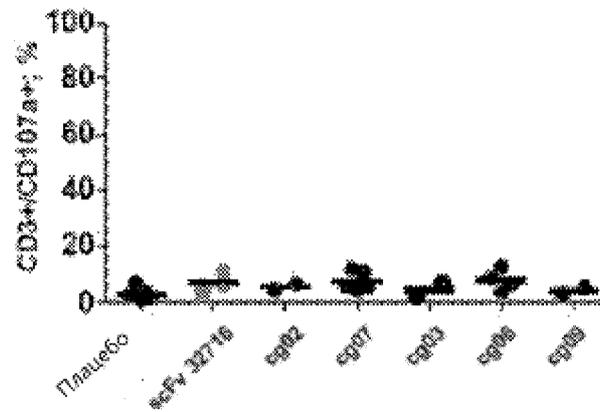
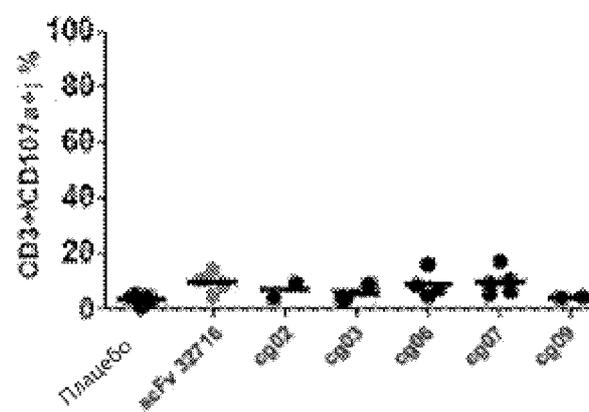
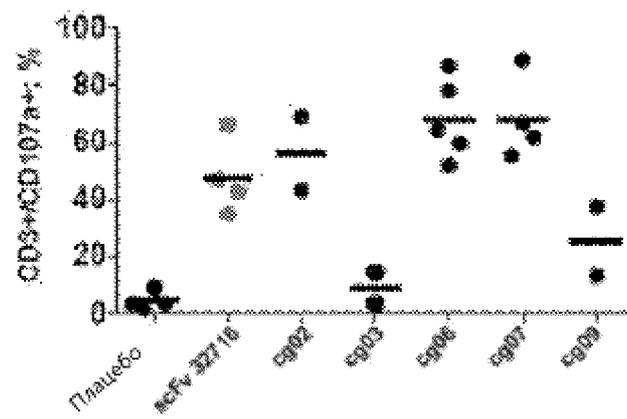
Фиг. 3А



Фиг. 3В

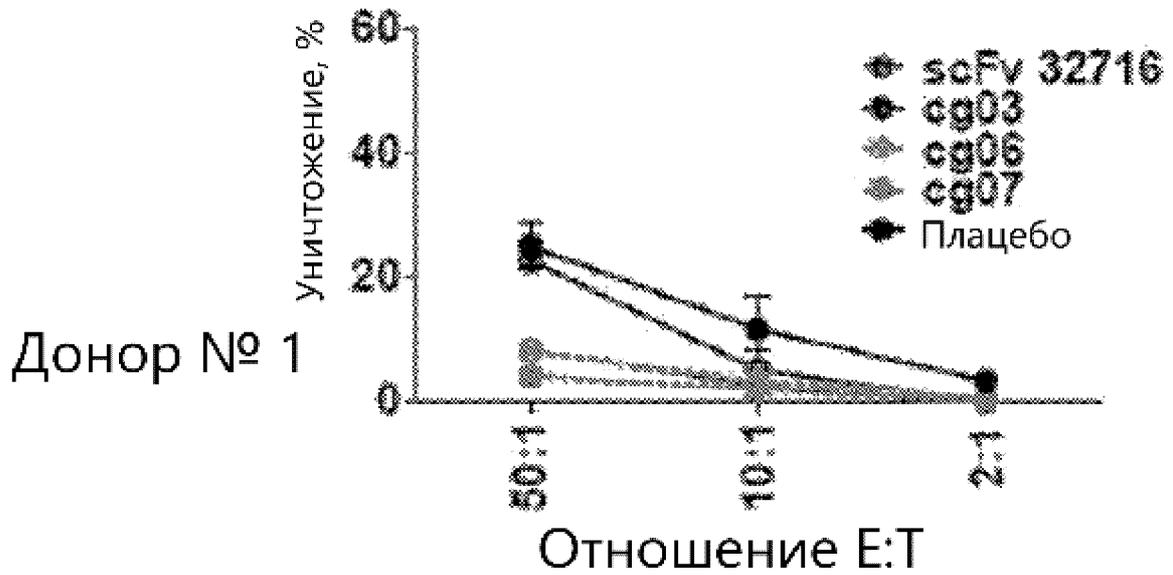


Фиг. 4А Т-клетки отдельно

Фиг. 4В Т-клетки + CD123⁺ K562Фиг. 4С Т-клетки + CD123⁺ В0СМ

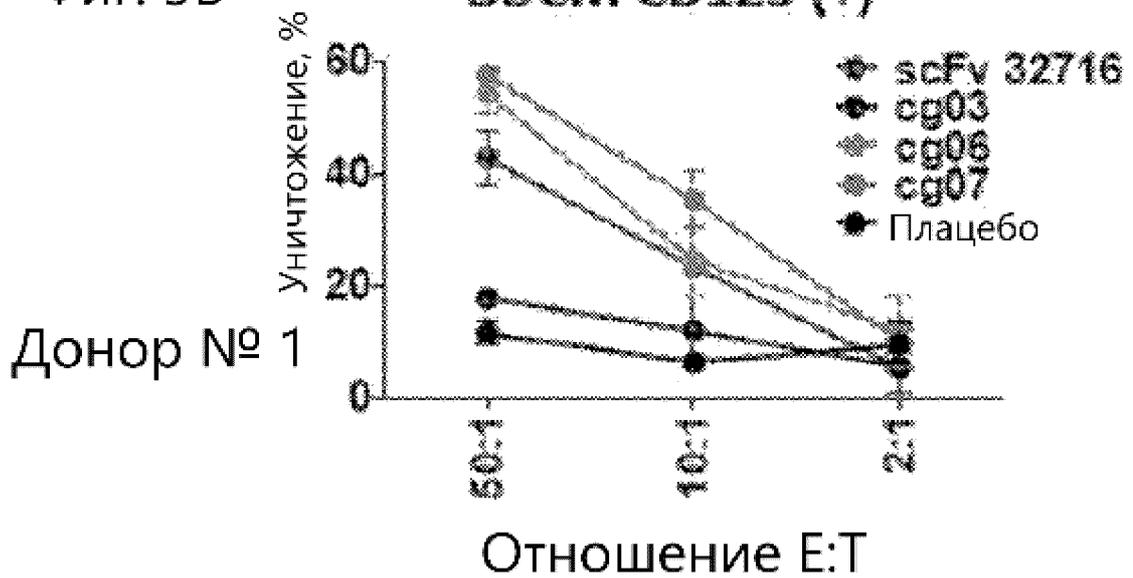
Фиг. 5А

K562 CD123(-)



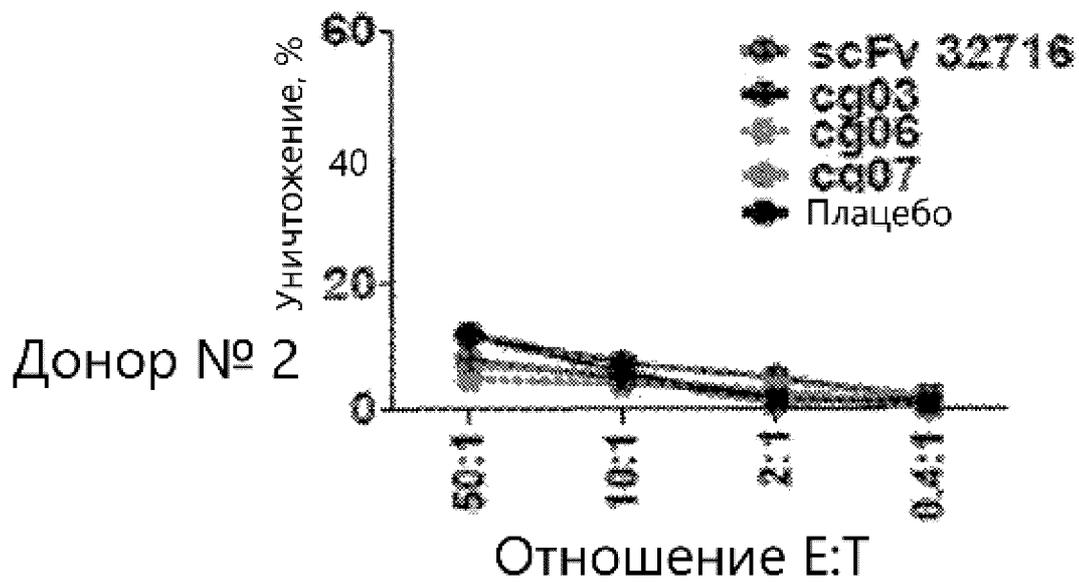
Фиг. 5В

BDCM CD123 (+)



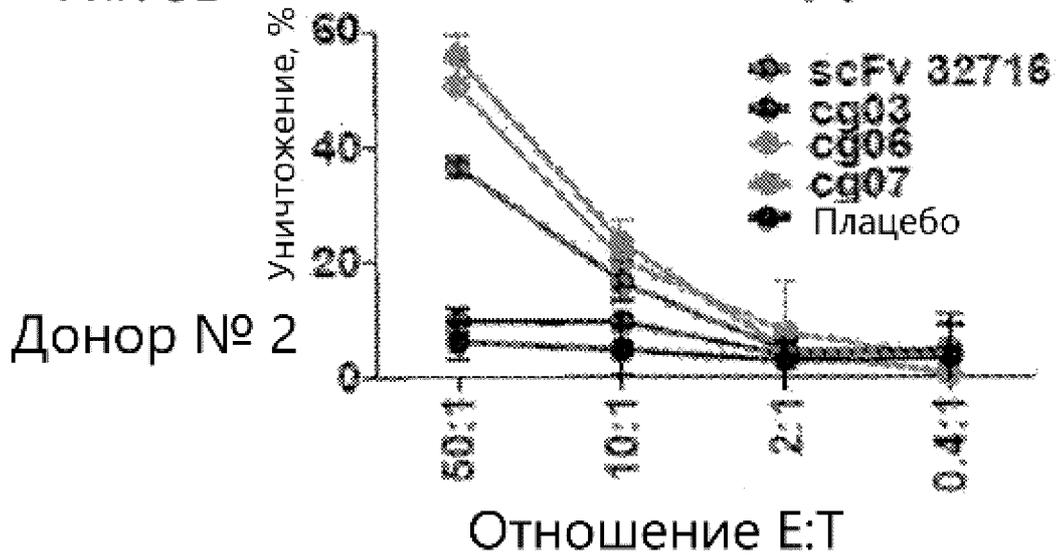
Фиг. 5С

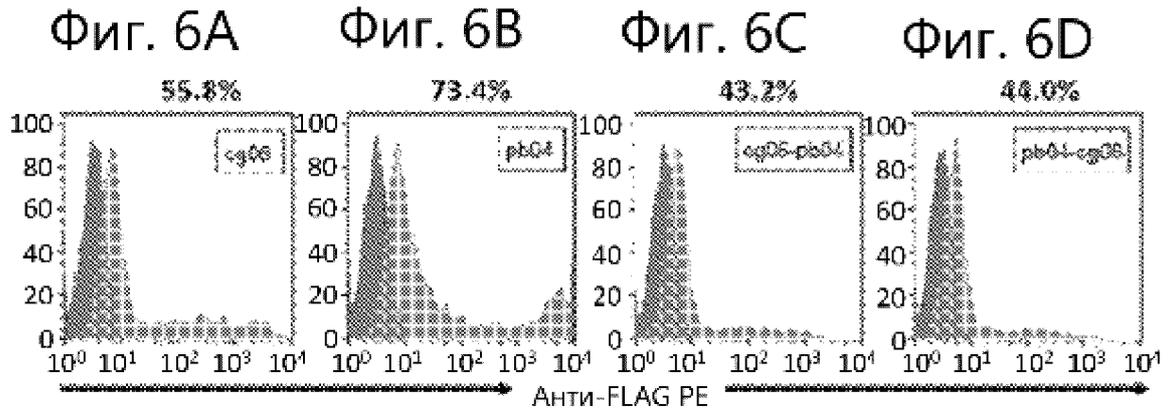
K562 CD123(-)



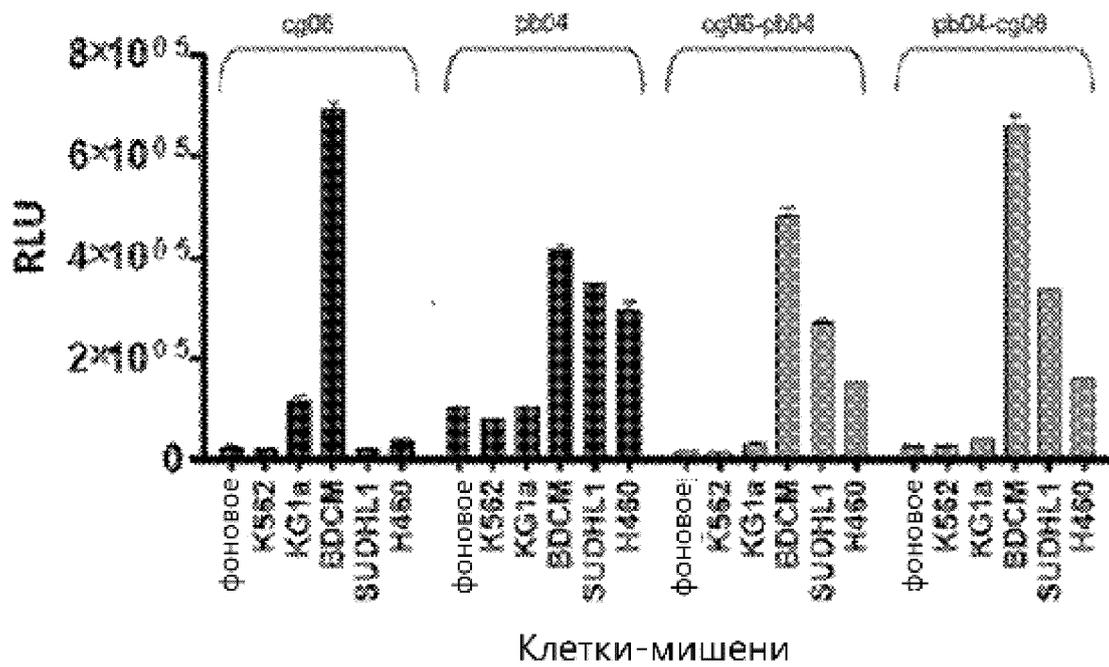
Фиг. 5D

BDCM CD123 (+)

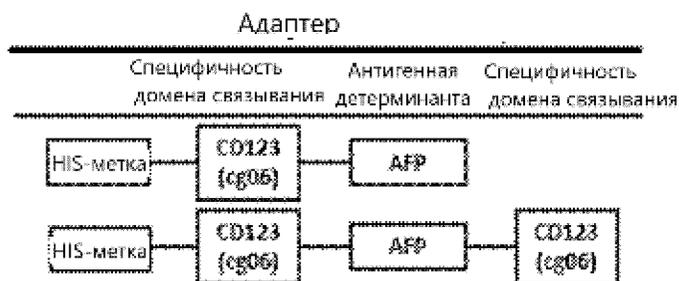
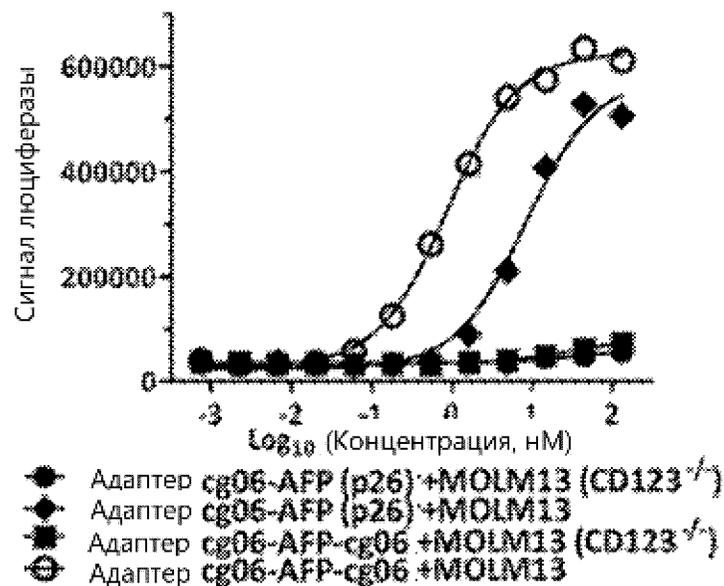




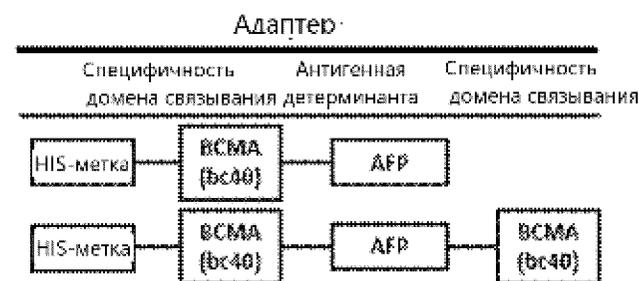
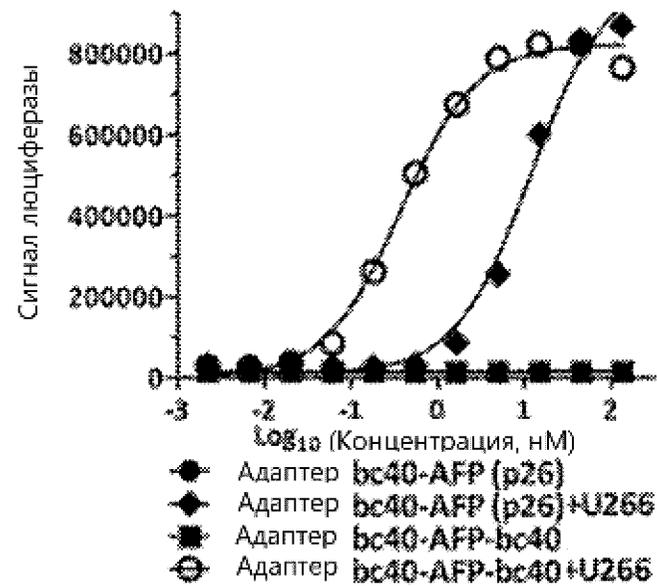
Фиг. 6Е



Фиг. 7А



Фиг. 7В

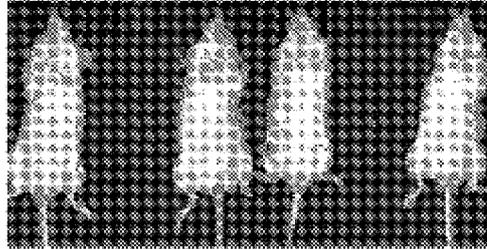


Фиг. 8

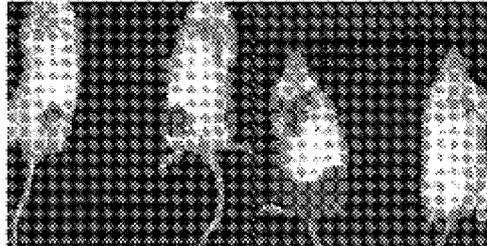
ID мыши

1 2 3 4

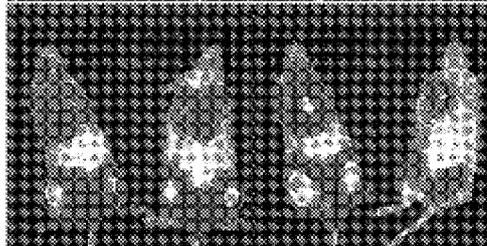
18 сутки



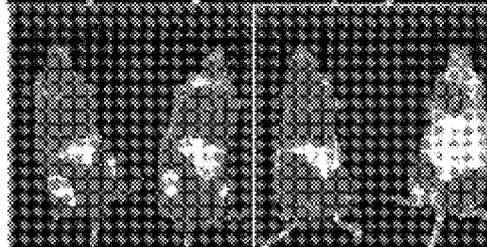
25 сутки



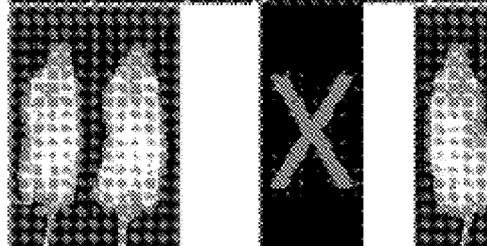
32 сутки



38 сутки



45 сутки



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MG-6666-0200	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 18/60887	International filing date (<i>day/month/year</i>) 14 November 2018 (14.11.2018)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 14 November 2017 (14.11.2017)
Applicant ARCELLX, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed.
 a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- the text is approved as submitted by the applicant.
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- the text is approved as submitted by the applicant.
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
 as suggested by the applicant.
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/60887

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/60887

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 10, 13-31, 36-42
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
 ---Please see continuation in first extra sheet -----

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-9, 11, 12, limited to SEQ ID NO:11

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 18/60887

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/10, C40B 40/02, C12Q 1/00, C07K 16/00, A61K 38/17, A61K 35/17 (2019.01) CPC - C07K 2318/20, C07K 2319/30, C07K 2319/00, C12N 15/1037, C12N 15/1044, C40B 40/02, C12Q 1/00, C07K 16/00, A61K 38/1774, A61K 35/17, A61P 35/02, C07K 14/7051, C12N 5/0636</p>		
<p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<p>B. FIELDS SEARCHED</p>		
<p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document</p>		
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document</p>		
<p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document</p>		
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p>		
<p>Category*</p>	<p>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</p>	<p>Relevant to claim No.</p>
A	WO 2016/164308 A1 (SUBDOMAIN LLC et al.) 13 October 2016 (13.10.2016) Abstract; para [0007]; para [0193]; para [0522]; SEQ ID NO: 127	1-9, 11, 12
A	US 2016/0311878 A1 (SAMSUNG ELECTRONICS CO. LTD.) 27 October 2016 (27.10.2016) Claim 7; SEQ ID NO: 14	1-9, 11, 12
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.</p>		<p><input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
<p>Date of the actual completion of the international search 16 March 2019</p>		<p>Date of mailing of the international search report 07 APR 2019</p>
<p>Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300</p>		<p>Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/60887

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, Claims 1-9, 11, 12, directed to a protein comprising a D Domain (DD) target binding domain wherein the DD domain binds one of BCMA, CD123, AFP, AFPp26, CS1 and HER2, fused to a heterologous polypeptide, and chimeric antigen receptors comprising said DD-fusion proteins.

The DD-fusion polypeptides will be searched to the extent that the DD domain specifically binds BCMA and comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11, and a chimeric antigen receptor comprising said DD-fusion protein that specifically binds BCMA and comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11. It is believed that claims 1-9, 11, 12 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the DD domain specifically binds BCMA and comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11.

Additional DD-domain target binding polypeptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected DD-domain target binding polypeptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a DD-domain target binding polypeptide that specifically binds CD 123 and comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 307 (claims 1-9, 11, 12).

Group II+, claims 32-35, 43, 44, directed to a method of treating a subject having cancer by administering an immune cell comprising a DD-domain containing chimeric antigen receptor (CAR) to the subject. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The method may be searched, for example, to encompass an immune cell comprising a chimeric antigen receptor (CAR) wherein the CAR comprises: a target binding domain comprising a DD having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 11 for an additional fee and election as such. It is believed that claims 32-35, 43, 44 read on this exemplary invention. Additional methods to encompass immune cells comprising a chimeric antigen receptor (CAR) with a target binding domain comprising additional DD domains will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected method(s). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a method encompass an immune cell comprising a chimeric antigen receptor (CAR) wherein the CAR comprises: a target binding domain comprising a DD having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 307 (claims 32-35, 43, 44).

The inventions listed as Group I+ and II+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Group I+ and Group II+ each include the special technical feature of a unique amino acid sequence of a DD-domain target binding polypeptide. Each unique amino acid sequence is considered a distinct technical feature.

Additionally, Group I+ does not require an immune cell comprising a DD-domain containing polypeptide or a method of treating a subject having cancer, that is required by Group II+.

Group II+ does not require a composition of a protein comprising a D Domain (DD) target binding domain, that is required by Group I+.

Common technical features

The inventions of Group I+ and Group II+ share the common technical feature of a D Domain (DD) target binding domain fused to a heterologous polypeptide. However, this common technical feature is previously disclosed by WO 2016/164308 A1 to Subdomain LLC et al., (hereinafter 'Subdomain').

Subdomain teaches D Domain (DD) target binding domain fused to a heterologous polypeptide (Abstract - 'Provided herein are de novo binding domain containing polypeptides (DBDpp) that specifically bind a target of interest. Nucleic acids encoding the DBDpp, and vectors and host cells containing the nucleic acids are also provided. Libraries of DBDpp, methods of producing and screening such libraries and the DBDpp identified from such libraries and screens are also encompassed. Methods of making and using the DBDpp are additionally provided. Such uses include, without limitation, affinity purification, and diagnostic and therapeutic applications'; para [0007] - 'DBDpp including DBDpp fusion proteins are also provided, as are methods of making and using the DBDpp').

-----please see continuation on next sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/60887

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

-contd. from previous sheet-----

No technical features are shared between the amino acid sequences of Groups I+ and, accordingly, Group I+ inventions lack unity a priori.

Additionally, even if Group I+ were considered to share the technical features of including: D Domain (DD) target binding domain fused to a heterologous polypeptide, wherein the DD domain has a defined binding specificity, these shared technical features are previously disclosed by Subdomain (abstract; para [0008] - 'In several embodiments, there is provided a binding agent that binds with a high degree of specificity to a target of interest.').

No technical features are shared between the specific amino acid sequences of polypeptides of Groups II+ and, accordingly, Group II+ inventions lack unity a priori.

Additionally, even if Group II+ were considered to share the technical features of including: treating a subject having cancer, by administering an immune cell comprising a chimeric antigen receptor (CAR) to the subject, wherein the CAR comprises: a target binding domain comprising a DD domain, these shared technical features are previously disclosed by Subdomain (para [0021] - 'Several embodiments, also provide for a chimeric antigen receptor (CAR), wherein the CAR includes a targeting domain, a transmembrane domain, and an intracellular signaling domain. In several embodiments, the targeting domain is made up of, at least in part, a target-binding polypeptide as disclosed herein.'). para [0010] - 'For example, in several embodiments, the target of interest specifically bound by the polypeptide is a cancer antigen. In some embodiments, the cancer antigen specifically bound by polypeptide is PD- LI .'; para [0025] - 'Thus, there are provided, in several embodiments methods of treating a subject having cancer, comprising administering to the subject an immune cell comprising a chimeric antigen receptor (CAR), wherein the CAR comprises a target binding domain, wherein the target binding domain comprises a polypeptide having an amino acid sequence comprising:
MGSWX5EFX8X9RLX12AIX15X16RLX19ALGGSEAELAAFEKEIAAFESLQAYKKGKGNPEVEX5 5LRX58
59AAX62IRX65X66LQAYRHN (SEQ ID NO:4), a transmembrane domain, and an intracellular domain (comprising a signaling domain).').

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ and II+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE: claims 10, 13-31, 36-42 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Note, Claim 9 is dependent on itself. Claim 9 is instead construed as dependent on claim 8.

Note, Claim 21 as drafted depends upon claims 18-21. Since a claim cannot be dependent upon itself, claim 21 is construed as dependent on claims 18-20.

Note, The application contains two claims labeled as claim 26. The first Claim 26 is construed as Claim 26A, and Claim 27 is treated as dependent of claim 26A. The second Claim 26 is construed as Claim 26B, and Claim 28 is treated as dependent of claim 26B.

Note, SEQ ID NO:925 corresponds to two different sequences: CS1 mature ECD; and HER2-targeted DD domain. SEQ ID NO:925 is construed as HER2-targeted DD domain.

Note, SEQ ID NO:927 corresponds to two different sequences: HER2 mature ECD; and HER2-targeted DD domain. SEQ ID NO:927 is construed as HER2-mature ECD.