



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.25

(21) Номер заявки
202290405

(22) Дата подачи заявки
2020.08.14

(51) Int. Cl. **A61P 35/00** (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ К TCR С ВАРИАБЕЛЬНОЙ ЦЕПЬЮ ДЕЛЬТА 1

(31) 1911799.3; 2010760.3

(32) 2019.08.16; 2020.07.13

(33) GB

(43) 2022.06.09

(86) PCT/GB2020/051959

(87) WO 2021/032963 2021.02.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГАММАДЕЛЬТА ТЕРАПЬЮТИКС
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Маунт Нагали, Полякова Оксана,
Гуд Роберт, Уден Марк, Мехта Радж
Джайсукхлал, Нуссбаумер Оливер
(GB)**

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

(56) WO-A1-2019147735
WO-A1-2017197347
GABRIELLE M SIEGERS ET AL.: "Cytotoxic and Regulatory Properties of Circulating V[delta]1+ [gamma][delta] T Cells: A New Player on the Cell Therapy Field?", MOLECULAR THERAPY, vol. 22, no. 8, 4 June 2014 (2014-06-04), pages 1416-1422, XP055159816, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2014.104, page 1418

KNIGHT ANDREA ET AL.: "Human Vdelta1 gamma-delta T cells exert potent specific cytotoxicity against primary multiple myeloma cells", CYTOTHERAPY, ISIS MEDICAL MEDIA, OXFORD, GB, vol. 14, no. 9, 1 October 2012 (2012-10-01), pages 1110-1118, XP009163614, ISSN: 1465-3249, DOI: 10.3109/14653249.2012.700766, the whole document

ROMAGNE F ET AL.: "Structural analysis of gamma delta TCR using a novel set of TCR gamma and delta chain-specific monoclonal antibodies generated against soluble gamma delta TCR Evidence for a specific conformation adopted by the Jdelta2 region and for a Vdelta1 polymorphism", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 189, no. 1, 16 January 1996 (1996-01-16), pages 25-36, XP004020910,

ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/0022-1759(95)00224-3, the whole document

WO-A1-2016166544

DREW C. DENIGER ET AL.: "Clinical Applications of Gamma Delta T Cells with Multivalent Immunity", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 5, 1 December 2014 (2014-12-01), XP055650678, DOI: 10.3389/fimmu.2014.00636, the whole document

JONATHAN FISHER ET AL.: "Engineering Approaches in Human Gamma Delta T Cells for Cancer Immunotherapy", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 9, 26 June 2018 (2018-06-26), XP055564688, DOI: 10.3389/fimmu.2018.01409, the whole document

CHITADZE GURANDA ET AL.: "The Ambiguous Role of [gamma][delta] T Lymphocytes in Antitumor Immunity", TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER LTD. * TRENDS JOURNALS, GB, vol. 38, no. 9, 11 July 2017 (2017-07-11), pages 668-678, XP085170623, ISSN: 1471-4906, DOI: 10.1016/J.IT.2017.06.004, the whole document

MARTIN S. DAVEY ET AL.: "Clonal selection in the human V[delta]1 T cell repertoire indicates [gamma][delta] TCR-dependent adaptive immune surveillance", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 8, no. 1, 1 March 2017 (2017-03-01), XP055738905, DOI: 10.1038/ncomms14760, the whole document

GARBER KEN: "[gamma][delta] T cells bring unconventional cancer-targeting to the clinic - again", NATURE BIOTECHNOLOGY, GALE GROUP INC., NEW YORK, US, vol. 38, no. 4, 1 April 2020 (2020-04-01), pages 389-391, XP037096945, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/S41587-020-0487-2 [retrieved on 2020-04-07] the whole document

SEBESTYEN ZSOLT ET AL.: "Translating gammadelta ([gamma][delta]) T cells and their receptors into cancer cell therapies", NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 19, no. 3, 6 September 2019 (2019-09-06), pages 169-184, XP037049360, ISSN: 1474-1776, DOI: 10.1038/S41573-019-0038-Z [retrieved on 2019-09-06] the whole document

HANS-HEINRICH OBERG ET AL.: "Bispecific antibodies enhance tumor-infiltrating T cell cytotoxicity against autologous HER-2-expressing high-grade ovarian tumors", JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, vol. 107, no. 6, 13 December 2019 (2019-12-13), pages 1081-1095, XP055740419, GB, ISSN: 0741-5400, DOI: 10.1002/JLB.5MA1119-265R, the whole document

(57) Данное изобретение относится к антителам к Vδ1 или их фрагментам для применения в способах лечения онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом.

048115 B1

048115 B1

Область изобретения

Данное изобретение относится к терапевтическому применению антител и их фрагментов, направленных к Т-клеточному рецептору гамма-дельта Т-клеток.

Уровень техники

Растущий интерес к Т-клеточной иммунотерапии онкологического заболевания сосредоточен на очевидной способности субпопуляций CD8⁺ и CD4⁺ альфа-бета ($\alpha\beta$) Т-клеток распознавать раковые клетки и опосредовать защитные функциональные потенциалы хозяина, особенно при депрессии клинически опосредованным антагонизмом ингибирующих путей, осуществляемых PD-1, CTLA-4 и другими рецепторами. Однако $\alpha\beta$ Т-клетки ограничены МНС, что может привести к реакции "трансплантат против хозяина".

Гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки) представляют собой подмножество Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности особый, определяющий $\gamma\delta$ Т-клеточный рецептор (TCR). Этот TCR состоит из одной гамма (γ) и одной дельта (δ) цепи, каждая из которых претерпевает перестройку цепи, но имеет ограниченное количество V-генов по сравнению с $\alpha\beta$ Т-клетками. Основными сегментами гена TRGV, кодирующими V γ , являются TRGV2, TRGV3, TRGV4, TRGV5, TRGV8, TRGV9 и TRGV11, а также нефункциональные гены TRGV10, TRGV11, TRGVA и TRGVB. Наиболее часто встречающиеся сегменты гена TRDV кодируют V81, V82 и V83, а также несколько V-сегментов, которые имеют обозначения как V δ , так и V α (Adams et al., 296:30-40 (2015) Cell Immunol.). $\gamma\delta$ Т-клетки человека можно в широком смысле классифицировать на основе их цепей TCR, поскольку определенные γ и δ типы обнаруживаются в клетках более широко, но не исключительно, в одном или более типах тканей. Например, большинство резидентных в крови $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют V82 TCR, обычно V γ 9V δ 2, тогда как это менее распространено среди резидентных в ткани $\gamma\delta$ Т-клеток, таких как клетки кожи, которые чаще используют V81 TCR в паре с гамма-цепями, для примера часто в паре с V γ 4 в кишечнике.

Для того, чтобы применять $\gamma\delta$ Т-клетки для иммунотерапии, требуются средства либо для увеличения клеток *in situ*, либо для их сбора и размножения *ex vivo* перед повторной инфузией. Последний подход был ранее описан с использованием добавления экзогенных цитокинов, например, см. WO2017/072367 и WO2018/212808. Были описаны способы увеличения собственных $\gamma\delta$ Т-клеток пациента с использованием фармакологически модифицированных форм гидроксиметилбут-2-енилпирофосфата (НМБПП) или клинически одобренных аминокислотных фосфонатов. С помощью этих подходов было вылечено более 250 пациентов с онкологическим заболеванием, казалось бы, безопасно, но только с редкими случаями полной ремиссии. Однако все еще существует потребность в активирующих агентах, которые обладают доказанной способностью увеличивать количество $\gamma\delta$ Т-клеток.

Кроме того, связывающий или активирующий агент, способный преимущественно нацеливаться или связываться, или распознавать, или специфически модулировать или увеличивать количество клеток V81⁺ *in-situ*, может быть весьма желательным в качестве лекарственного средства.

Однако, несмотря на то, что существуют лекарственные средства, которые потенциально модулируют клетки V82⁺, включая аминокислотные фосфонаты, такие как Zometa® (золедроновая кислота), указанные лекарственные средства в первую очередь предназначены для замедления реабсорбции костной ткани. И независимо от указанной модуляции V82⁺, существует необходимость в разработке лекарственных средств, специально предназначенных для связывания, нацеливания, модуляции, активации или увеличения количества клеток V81⁺.

Кроме того, учитывая преобладающую тканевую природу клеток V81⁺, идеальное лекарственное средство, способное модулировать V81⁺, также будет проявлять меньше нежелательных эффектов "не по назначению" и быстрый почечный клиренс. Обычно указанные нежелательные эффекты могут проявляться при использовании низкомолекулярных химических веществ. Например, вышеупомянутые аминокислотные фосфонаты, способные модулировать отдельный класс клеток V82⁺ (как вторичный эффект по сравнению с первичным модулирующим действием на кости), связаны с почечной токсичностью, которая проявляется в ухудшении функции почек и потенциальной почечной недостаточности (например, Markowitz et al. (2003) Kidney Int. 64(1):281-289). Дополнительные нежелательные эффекты, перечисленные Европейским медицинским агентством для Zometa, включают анемию, реакции гиперчувствительности, гипертонию, артериальную фибрилляцию, миалгию, общую боль, недомогание, повышение уровня мочевины в крови, рвоту, опухание сустава, боль в груди и т.д.

Следовательно, существует потребность в улучшенных лекарственных средствах, специально предназначенных для нацеливания на клетки V81⁺ и для лечения инфекций, аутоиммунных состояний и онкологического заболевания. В частности, существует потребность в лекарственных средствах, которые можно вводить для облегчения признаков и симптомов заболевания путем специфического связывания клеток V81⁺, нацеливания на клетки V81⁺, специфической активации клеток V81⁺, специфического усиления пролиферации и/или цитотоксической активности клеток V81⁺ или специфического блокирования активации клеток V81⁺.

Сущность изобретения

Согласно первому аспекту предложено антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент для применения в способе лечения онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания. Будет понятно, что способы и композиции для применения, описанные в данном документе, относятся к введению антитела к $\nu\delta 1$ или его фрагмента непосредственно субъекту, подлежащему лечению.

В соответствии с дополнительным аспектом данного изобретения предлагается выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, которое связывается по меньшей мере с двумя антигенами-мишенями, причем первым по меньшей мере из двух антигенов-мишеней является $V\delta 1$, и которое включает один или более из следующих элементов:

CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: A1-A12 (из табл. 2); и/или

CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38-61.

В соответствии с дополнительным аспектом данного изобретения предлагается выделенное антитело к TCR с варибельной цепью дельта 1, мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, которое связывается по меньшей мере с двумя антигенами-мишенями, причем первый по меньшей мере из двух антигенов-мишеней представляет собой $V\delta 1$, и при этом мультиспецифическое антитело или его фрагмент, который связывается с эпитопом $V\delta 1$, содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислот 1-90 SEQ ID NO: 1.

Согласно дополнительному аспекту данного изобретения предлагается выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства.

Согласно дополнительному аспекту данного изобретения предлагается выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в данном документе, для применения при лечении онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Обнаружение непосредственно покрытого антигена с анти- $V\delta 1Ab$ с помощью ИФА (REA173, Miltenyi Biotec). Обнаружение было замечено только с теми антигенами, которые содержат домен $V\delta 1$. Формат лейциновой молнии (LZ) кажется более эффективным, чем формат Fc, что согласуется с клеточным анализом конкуренции потока (данные не показаны).

Фиг. 2. Данные DELFIA поликлонального фага для выборок DV1. А) Выбор гетеродимера: формат гетеродимерного LZ TCR в 1 и 2 раундах с деселекцией гетеродимерного LZ TCR в обоих раундах. В) Отбор гомодимеров: 1 раунд выполняли с использованием гомодимерного Fc-гибридного TCR с отрицательным отбором на Fc IgG1 человека с последующим 2 раундом на гетеродимерном LZ TCR с отрицательным отбором на гетеродимерном LZ TCR. Каждый график содержит две полосы для каждой цели, представляющие выбор из разных библиотек.

Фиг. 3. Захват IgG: слева) Сенсограммы взаимодействия анти-L1 IgG с L1, справа) подходит для устойчивого состояния, если доступно. Все эксперименты проводились при комнатной температуре на приборе МАСС-2. Подгонка устойчивого состояния в соответствии со связыванием Ленгмюра 1:1.

Фиг. 4. Результаты анализа снижения экспрессии TCR для клонов 1245_P01_E07, 1252_P01_C08, 1245_P02_G04, 1245_P01_B07 и 1251_P02_C05 (А), или клонов 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06 1245_P01_G09, 1138_P01_B09, 1251_P02_G10 и 1252_P01_C08 (В).

Фиг. 5. Результаты анализа дегрануляции Т-лимфоцитов для клонов 1245_P01_E07, 1252_P01_C08, 1245_P02_G04, 1245_P01_B07 и 1251_P02_C05 (А), или клонов 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06, 1245_P01_G09, 1138_P01_B09 и 1251_P02_G10 (В).

Фиг. 6. Результаты анализа на уничтожение (анализ на основе потока ТНР-1) для клонов 1245_P01_E07, 1252_P01_C08, 1245_P02_G04, 1245_P01_B07 и 1251_P02_C05 (А), или клонов 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06, 1245_P01_G09, 1138_P01_B09 и 1251_P02_G10 (В).

Фиг. 7. Данные картирования эпитопов для 1245_P01_E07. Графическое представление сайта связывания эпитопа 1245_P01_E07 на SEQ ID NO: 1.

Фиг. 8. Данные картирования эпитопов для 1252_P01_C08. Графическое представление сайта связывания эпитопа 1252_P01_C08 на SEQ ID NO: 1.

Фиг. 9. Данные картирования эпитопов для 1245_P02_G04. Графическое представление сайта связывания эпитопа 1245_P02_G04 на SEQ ID NO: 1.

Фиг. 10. Данные картирования эпитопов для 1251_P02_C05. Графическое представление сайта связывания эпитопа 1251_P02_C05 на SEQ ID NO: 1.

Фиг. 11. Данные картирования эпитопов для 1141_P01_E01. Графическое представление сайта связывания эпитопа 1141_P01_E01 на SEQ ID NO: 1.

Фиг. 12. Общее количество клеток во время эксперимента 1 примера 10.

Образцы культивировали с различной концентрацией описанных в данном документе антител к V δ 1 и сравнивали с образцами, культивированными с антителами сравнения или контролями. Графики демонстрируют общее количество клеток на (А) день 7, (В) день 14 и (С) день 18.

Фиг. 13. Анализ Т-клеток V δ 1 во время эксперимента 1 примера 10. Графики демонстрируют (А) процентное содержание V δ 1 Т-клеток, (В) количество V δ 1 Т-клеток и (С) V δ 1-кратное изменение в образцах на 18 день.

Фиг. 14. Общее количество клеток во время эксперимента 2 примера 10.

Образцы культивировали с различной концентрацией описанных в данном документе антител к V δ 1 и сравнивали с образцами, культивированными с антителами сравнения или контролями. Графики демонстрируют общее количество клеток на (А) день 7, (В) день 11, (С) день 14 и (D) день 17.

Фиг. 15. Анализ Т-клеток V δ 1 во время эксперимента 2 примера 10. Графики демонстрируют (А) процентное содержание V δ 1 Т-клеток, (В) количество V δ 1 Т-клеток и (С) V δ 1-кратное изменение в образцах на 17 день.

Фиг. 16. Анализ состава клеток. Типы клеток, присутствующие в образцах (включая клетки, не относящиеся к V δ 1), измеряли на 17-й день эксперимента 2. Клетки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии на поверхностную экспрессию V δ 1, V δ 2 и α TCR. Процентные значения также представлены в табл. 6.

Фиг. 17. Результаты киллинг-анализа SYTOX-flow. Функциональность клеток была протестирована с использованием киллинг-анализа SYTOX-flow, и результаты представлены для (А) эксперимента 1 на 14 день с использованием клеток в соотношении эффектор-мишень 10:1 (Е:Т) и (В) эксперимента 2 на день 17 (после замораживания-оттаивания) с использованием клеток в соотношении Е:Т 1:1 и 10:1.

Фиг. 18. Общее количество клеток после замораживания-оттаивания. График демонстрирует общее количество клеток после 7 дней культивирования клеток после замораживания-оттаивания для культур, контактировавших с антителами B07, C08, E07, G04 или ОКТ-3 перед замораживанием.

Фиг. 19. Мониторинг роста клеток. Общее количество клеток контролировали до 42 дня для клеток, культивированных после замораживания-оттаивания.

Фиг. 20. Исследования эквивалентности связывания модифицированных антител к V δ 1.

Фиг. 21. Исследования эквивалентности связывания антитела к V δ 1 на антигене V δ 1 зародышевой линии человека и его полиморфном варианте.

Фиг. 22. Антитело к V δ 1 вызывало повышение уровня секреции цитокинов клетками V δ 1+. Полученные из ткани γ δ Т-клетки инкубировали с указанными антителами. А) Наблюдаемые уровни TNF-альфа. В) Наблюдаемые уровни IFN-гамма.

Фиг. 23. Антитело к V δ 1 приводило к увеличению уровней/активности гранзима В клеток V δ 1+. Раковые клетки совместно культивировали с тканевыми γ δ Т-клетками в течение одного часа при установленном соотношении Т:Е 1:20 и с указанными антителами. Результаты показывают количество гранзима В, обнаруженное в раковых клетках в конце совместного культивирования.

Фиг. 24. Антитело к V δ 1 обеспечивает модуляцию и пролиферацию иммунных клеток в ткани человека. Пункционные биопсии кожи человека (от пяти разных доноров) инкубировали в течение 21 дня в культуре с указанными антителами. А) Количество жизнеспособных пан- γ δ + клеток. В) Количество жизнеспособных V δ 1+ клеток. С) Процент жизнеспособных, дважды положительных V δ 1+ клеток CD25+.

Фиг. 25. Антитело к V δ 1 вызывало модуляцию и пролиферацию инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в опухолях человека. Исследования почечно-клеточной карциномы (RCC) \pm антител А) Кратность увеличения клеток TIL V δ 1+. В) Общее количество клеток TIL V δ 1+. С) Пример стратегии гейтирования D) Сравнительный фенотипический профиль клеточной поверхности клеток TIL V δ 1+. Е) Анализ TIL V δ 1-отрицательной закрытой фракции.

Фиг. 26. Антитело к V δ 1 вызывало усиление цитотоксичности, опосредованной V δ 1+, и цитотоксичности, специфичной для пораженных клеток. Анализы цитотоксичности/активности в модельных системах, включающих трикультуру эффекторных клеток V δ 1+, моноцитарных раковых клеток ТНР-1 и здоровых первичных моноцитов. А) Количественное определение количества клеток ТНР-1 и моноцитов в тройной совместной культуре с γ δ Т-клетками в присутствии моноклональных антител к V δ 1 или контролей. В) Гистограмма, выделяющая окно между уничтожением конкретных пораженных клеток и сохранением здоровых клеток: Левая гистограмма; кратное увеличение уничтожения пораженных клеток (ТНР-1) по сравнению с уничтожением нездоровых клеток (первичных моноцитов человека); Правая гистограмма; те же данные, но представленные как процентное усиление уничтожения по сравнению с контролями С) Табличные результаты, суммирующие процентное улучшение эффективности уничтожения эффекторными клетками V δ 1+ клеток-мишеней ТНР-1 \pm mAb. D) Табличные результаты значений EC50, рассчитанных по фиг. (А), представленных в виде количества γ δ Т-клеток, необходимого для 50% уничтожения клеток ТНР-1.

Фиг. 27. Мультиспецифические антитела вызывали усиление цитотоксичности, опосредованной эффекторными клетками V δ 1+. Нацеливание на тканецентрический антиген, связанный с заболеванием:

(A-D) Пример совместного культивирования эффекторных клеток V δ 1+ с раковыми клетками A-431 \pm мультиспецифические антитела, содержащие биспецифические связывающие фрагменты анти-V δ 1 х анти-TAA (EGFr), где связывающий домен анти-V δ 1 VL+ VH (для первой мишени) объединен с доменом CH1-CH2-CH3 связывающего фрагмента анти-EGFr (для второй мишени). (E-H) Пример совместного культивирования эффекторных клеток V δ 1+ с раковыми клетками A-431 \pm мультиспецифические антитела, содержащие биспецифические связывающие фрагменты анти-V δ 1 х анти-TAA (EGFr), где связывающий домен анти-V δ 1 (для первой мишени) включает полноразмерное антитело (VH-CH1-CH2-CH3/VL-CL), затем объединенное с фрагментом связывания scFv, происходящим от цетуксимаба к EGFr (для второй мишени). (I-J) Альтернативный подход к представлению данных: Процент улучшения цитотоксичности эффекторных клеток V δ 1+ по отношению к клеткам EGFR + по сравнению с их составными частями за счет мультиспецифических антител.

Фиг. 28. Мультиспецифическое антитело вызывало усиление цитотоксичности, опосредованной V δ 1+, и цитотоксичности, специфичной для пораженных клеток.

Нацеливание на антиген, связанный с гемопоэтическим заболеванием (A) Соотношения E:T, необходимые для индуцирования 50% уничтожения клеток Raji (B) Процентное улучшение при добавлении мультиспецифических антител к V δ 1-CD19.

Подробное описание сущности изобретения

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, обычно понятное специалисту в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. В контексте данного документа, следующие термины имеют значения, приписываемые им ниже.

Гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетки представляют собой небольшое подмножество Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности особый, определяющий Т-клеточный рецептор (TCR). Этот TCR состоит из одной гамма (γ) и одной дельта (δ) цепи. Каждая цепь содержит переменную (V) область, константную (C) область, трансмембранную область и цитоплазматический хвост. V-область содержит сайт связывания антигена. Существует два основных подтипа $\gamma\delta$ Т-клеток человека: один доминирует в периферической крови, а другой доминирует в негематопоэтических тканях. Два подтипа могут определяться типом δ и/или γ , присутствующих в клетках. Например, $\gamma\delta$ Т-клетки, которые доминируют в периферической крови, в первую очередь экспрессируют дельта-переменную цепь 2 (V δ 2). $\gamma\delta$ Т-клетки, которые доминируют в негематопоэтических тканях (т.е. являются резидентными в тканях), в первую очередь экспрессируют дельта-переменную цепь 1. Ссылки на "V δ 1 Т-клетки" относятся к $\gamma\delta$ Т-клеткам с цепью V δ 1, то есть клеткам V δ 1+.

Ссылки на "дельта-переменную 1" могут также обозначаться как V δ 1 или Vd1, в то время как нуклеотид, кодирующий цепь TCR, содержащую эту область, может называться "TRDV1". Антитела или их фрагменты, которые вступают в контакт с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, все являются эффективно антителами или их фрагментами, которые связываются с V δ 1, и могут называться "антителами к TCR с переменной цепью дельта 1 или их фрагментами" или "антителами к V δ 1 или их фрагментами".

В данном документе сделаны дополнительные ссылки на другие дельта-цепи, такие как цепь "переменная цепь дельта 2". На них можно сослаться аналогичным образом. Например, переменная цепь дельта 2 может обозначаться как V δ 2, а нуклеотид, кодирующий цепь TCR, содержащую эту область, может обозначаться как "TRDV2". В предпочтительных вариантах реализации антитела или их фрагменты, которые вступают в контакт с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, не вступают в контакт с другими дельта-цепями, такими как V δ 2.

В данном документе также сделаны ссылки на "гамма-переменные цепи". Они могут обозначаться как γ -цепями или V γ , тогда как нуклеотид, кодирующий цепь TCR, содержащую эту область, может обозначаться TRGV. Например, TRGV4 относится к цепи V γ 4. В предпочтительных вариантах реализации антитела или их фрагменты, которые вступают в контакт с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, не вступают в контакт с гамма-цепями, такими как V γ 4.

Термин "антитело" включает любую белковую конструкцию антитела, содержащую по меньшей мере один переменный домен антитела, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт (ABS). Антитела включают, но не ограничиваются ими, иммуноглобулины типов IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их подтипы). Общая структура антител иммуноглобулина G (IgG), собранных из двух идентичных полипептидов тяжелой (H)-цепи и двух идентичных полипептидов легкой (L)-цепи, хорошо известна и высококонсервативна у млекопитающих (Padlan (1994) Mol. Immunol. 31:169-217).

Обычное антитело или иммуноглобулин (Ig) представляет собой белок, содержащий четыре полипептидных цепи: две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи. Каждая цепь разделена на константную область и переменную область. Переменные домены тяжелой (H) цепи сокращенно обозначены в данном документе как VH, а переменные домены легкой (L) цепи сокращенно обозначены в данном документе как VL. Эти домены, связанные с ними домены и производные от них домены, могут назы-

ваться в данном документе переменными доменами иммуноглобулиновой цепи. Домены VH и VL (также называемые областями VH и VL) могут быть дополнительно подразделены на области, называемые "определяющими комплементарность областями" ("CDR"), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми "каркасными областями" ("FR"). Каркасные и определяющие комплементарность области были точно определены (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition U.S. Department of Health and Human Services, (1991) NIH Publication Number 91-3242). Существуют также альтернативные соглашения о нумерации последовательностей CDR, например, изложенные в Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883. В обычном антителе каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Обычный тетрамер антитела двух тяжелых цепей иммуноглобулина и двух легких цепей иммуноглобулина образуется с тяжелой и легкой цепями иммуноглобулина, связанными, например, посредством дисульфидных связей и тяжелыми цепями, связанными аналогично.

Константная область тяжелой цепи включает три домена, CH1, CH2 и CH3. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Переменный домен тяжелых цепей и переменный домен легких цепей представляют собой связывающие домены, которые взаимодействуют с антигеном. Константные области антител обычно опосредуют связывание антитела с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Фрагмент антитела (который также может обозначаться как "фрагмент антитела", "фрагмент иммуноглобулина", "антигенсвязывающий фрагмент" или "антигенсвязывающий полипептид") в контексте данного документа относится к части антитела (или конструкции, которые содержат указанную часть), которая специфически связывается с мишенью, дельта-переменной цепью 1 (V δ 1) $\gamma\delta$ T-клеточного рецептора (например, молекула, в которой одна или более цепей иммуноглобулина не являются полноразмерной, но которые специфически связываются с мишенью).

Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "фрагмент антитела", включают:

- (i) Fab-фрагмент (одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1);
- (ii) фрагмент F(ab')₂ (двухвалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области);
- (iii) фрагмент Fd (состоящий из доменов VH и CH1);
- (iv) фрагмент Fv (состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела);
- (v) одноцепочечный переменный фрагмент, scFv (состоящий из доменов VL и VH, соединенных с помощью рекомбинантных методов с помощью синтетического линкера, который позволяет им быть в виде единой белковой цепи, в которой участки VL и VH соединяются в пары с образованием одновалентных молекул);
- (vi) VH (переменный домен цепи иммуноглобулина, состоящий из домена VH);
- (vii) VL (переменный домен цепи иммуноглобулина, состоящий из домена VL);
- (viii) домен антитела (dAb, состоящий из домена VH или VL);
- (ix) мини-тело (состоящее из пары фрагментов scFv, связанных посредством доменов CH3); и
- (x) диатело (состоящее из нековалентного димера фрагментов scFv, которые состоят из домена VH одного антитела, соединенного небольшим пептидным линкером с доменом VL другого антитела).

"Антитело человека" относится к антителам, имеющим переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Субъекты-люди, которым вводят указанные антитела человека, не вызывают межвидовых ответов антител (например, называемых НАМА-ответами - человеческие антимишьяные антитела) на первичные аминокислоты, содержащиеся в указанных антителах. Указанные антитела человека могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом, или соматической мутацией), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако этот термин не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты к каркасным последовательностям человека. Антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных агентов, таких как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированно в клетку-хозяина, антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека, антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным для генов иммуноглобулинов человека или антител, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК, также могут называться "рекомбинантными антителами человека".

Замена по меньшей мере на одного аминокислотного остатка в каркасной области переменного домена нечеловеческого иммуноглобулина на соответствующий остаток переменного домена человека называется "гуманизацией". Гуманизация переменного домена может снизить иммуногенность у человека.

"Специфичность" относится к количеству различных типов антигенов или антигенных детерми-

нант, с которыми может связываться конкретное антитело или его фрагмент. Специфичность антитела - это способность антитела распознавать определенный антиген как уникальное молекулярное образование и отличать его от другого. Антитело, которое "специфически связывается" с антигеном или эпитопом, представляет собой термин, хорошо понятный в данной области техники. Говорят, что молекула проявляет "специфическое связывание", если она вступает в контакт более часто, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным антигеном-мишенью или эпитопом, чем с альтернативными мишенями. Антитело "специфически связывается" с антигеном-мишенью или эпитопом, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, легче и/или дольше, чем оно связывается с другими веществами.

"Аффинность", представленная константой равновесия для диссоциации антигена с антигенсвязывающим полипептидом (KD), является мерой силы связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим сайтом на антителе (или его фрагменте): чем меньше значение KD, тем сильнее сила связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим полипептидом. Альтернативно, аффинность также может быть выражена как константа аффинности (KA), которая составляет 1/KD. Аффинность можно определить известными методами в зависимости от конкретного интересующего антигена.

Считается, что любое значение KD менее 10^{-6} указывает на связывание. Специфическое связывание антитела или его фрагмента с антигеном или антигенной детерминантой можно определить любым подходящим известным способом, включая, например, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания, такие как радиоиммуноанализ (РИА), иммуноферментный анализ (ИФА) и конкурентные сэндвич-анализы, равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрация, ИФА, поверхностный плазмонный резонанс или спектроскопия (например, с использованием флуоресцентного анализа) и их различные варианты, известные в данной области техники.

"Авидность" представляет собой меру силы связывания между антителом или его фрагментом и соответствующим антигеном. Авидность связана как со сродством между антигенной детерминантой и ее сайтом связывания антигена на антителе, так и с количеством подходящих сайтов связывания, присутствующих на антителе.

"V δ 1+ клетки ткани человека", "кроветворные клетки и клетки крови V δ 1+" и "опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL) V δ 1+" определяются как клетки V δ 1+, содержащиеся или происходящие из ткани человека, кроветворной системы или опухолей человека, соответственно. Все указанные типы клеток можно идентифицировать по их (i) местоположению или месту их происхождения, и (ii) их экспрессии V δ 1+ TCR.

"Модулирующие антитела" представляют собой антитела, которые вызывают измеримое изменение, включая, но не ограничиваясь, измеримое изменение клеточного цикла, и/или количества клеток, и/или жизнеспособности клеток, и/или одного или более маркеров клеточной поверхности, и/или в секреции одной или более секреторных молекул (например, цитокинов, хемокинов, лейкотриенов и т.д.), и/или функции (такой как цитотоксичность по отношению к клетке-мишени или пораженной клетке) при контакте или связывании с клеткой, экспрессирующей мишень, с которой связывается антитело. Способ "модуляции" клетки или их популяции относится к способу, при котором по меньшей мере одно подающееся измерению изменение в указанной клетке или клетках, или их секреция запускается для генерации одной или более "модулированных клеток".

"Иммунный ответ" представляет собой измеримое изменение по меньшей мере одной клетки, или одного клеточного типа, или одного эндокринного пути, или одного экзокринного пути иммунной системы (включая, помимо прочего, клеточно-опосредованный ответ, гуморальный ответ, цитокиновый ответ, хемокиновый ответ) при добавлении модулирующего антитела.

"Иммунная клетка" определяется как клетка иммунной системы, включая, помимо прочего, клетки CD34+, B-клетки, клетки CD45+ (общий антиген лимфоцитов), альфа-бета-T-клетки, цитотоксические T-клетки, T-хелперы, плазматические клетки, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эритроциты, тромбоциты, дендритные клетки, фагоциты, гранулоциты, врожденные лимфоидные клетки, естественные клетки-киллеры (NK) и гамма-дельта-T-клетки. Обычно иммунные клетки классифицируют с помощью комбинаторного анализа молекул на клеточной поверхности (например, с помощью проточной цитометрии) для идентификации, группировки или кластеризации для дифференциации иммунных клеток на субпопуляции. Затем они могут быть дополнительно разделены с помощью дополнительного анализа. Например, лимфоциты CD45+ могут быть далее подразделены на положительные по v δ и отрицательные по v δ популяции.

"Модельные системы" представляют собой биологические модели или биологические представленности, предназначенные для помощи в понимании того, как лекарственное средство, такое как антитело или его фрагмент, может действовать как лекарственное средство при ослаблении признака или симптома заболевания. Такие модели обычно включают использование *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* пораженных клеток, не пораженных клеток, здоровых клеток, эффекторных клеток и тканей и т.д., и в которых эффективность указанных лекарственных средств изучается и сравнивается.

"Пораженные клетки" проявляют фенотип, связанный с прогрессированием заболевания, такого как онкологическое заболевание, инфекция, такая как вирусная инфекция, или воспалительное состояние или воспалительное заболевание. Например, пораженная клетка может быть опухолевой клеткой, клеткой аутоиммунной ткани или клеткой, инфицированной вирусом. Соответственно, указанные пораженные клетки можно определить, как опухолевые, инфицированные вирусом или воспалительные.

"Здоровые клетки" относятся к нормальным клеткам, которые не являются пораженными. Их также можно назвать "нормальными" или "непораженными" клетками. Непораженные клетки включают незлокачественные, незатронутые или невоспалительные клетки. Указанные клетки часто используют вместе с соответствующими пораженными клетками для определения специфичности пораженных клеток, обеспечения лекарственным средством, и/или лучшего понимания терапевтического индекса лекарственного средства.

"Специфичность к пораженным клеткам" представляет собой меру того, насколько эффективна эффекторная клетка или ее популяция (такая как, например, популяция клеток V δ 1+) в различении и уничтожении пораженных клеток, таких как раковые клетки, при сохранении непораженных клеток или здоровых клеток. Этот потенциал может быть измерен в модельных системах и может включать сравнение склонности эффекторной клетки или популяции эффекторных клеток к селективному уничтожению или лизису пораженных клеток с потенциалом указанной эффекторной клетки/клеток уничтожить или лизировать непораженные, или здоровые клетки. Указанная специфичность к пораженным клеткам может определять потенциальный терапевтический индекс лекарственного средства.

"Повышенная специфичность к пораженным клеткам" описывает фенотип эффекторной клетки, такой как, например, клетка V δ 1+ или ее популяция, которая была модулирована для дальнейшего увеличения ее способности специфически уничтожать пораженные клетки. Это усиление можно измерить множеством способов, включая кратное или процентное увеличение специфичности или селективности уничтожения пораженных клеток.

Соответственно, антитело или его фрагмент (т.е. полипептид) по данному изобретению выделяют. "Выделенный" полипептид представляет собой полипептид, удаленный из исходного окружения. Термин "выделенный" может использоваться для обозначения антитела, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывает V δ 1, или его фрагмент, по существу не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от V δ 1). Термин "выделенный" также может использоваться для обозначения препаратов, в которых выделенное антитело достаточно чистое для терапевтического введения, когда оно составлено в качестве активного ингредиента фармацевтической композиции, или по меньшей мере на 70-80% (мас./мас.), более предпочтительно, чистота по меньшей мере 80-90% (мас./мас.), даже более предпочтительно, чистота 90-95%; и, наиболее предпочтительно, чистота по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (мас./мас.).

Соответственно, полинуклеотиды, используемые в настоящем изобретении, выделяют. "Выделенный" полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, удаленный из исходного окружения. Например, встречающийся в природе полинуклеотид выделяют, если он отделен от некоторых или всех сосуществующих материалов в природной системе. Полинуклеотид считается выделенным, если, например, он клонирован в вектор, который не является частью его естественного окружения, или если он содержится в кДНК.

Антитело или его фрагмент может быть "функционально активным вариантом", который также включает встречающиеся в природе аллельные варианты, а также мутанты или любые другие не встречающиеся в природе варианты. Как известно в данной области техники, аллельный вариант представляет собой альтернативную форму (поли)пептида, который характеризуется заменой, делецией или добавлением одной или более аминокислот, которые по существу не изменяют биологическую функцию полипептида. В качестве неограничивающего примера указанные функционально активные варианты могут все еще функционировать, когда каркасные области, содержащие CDR, модифицируются, когда модифицируются сами CDR, когда указанные CDR прививаются к альтернативным каркасам или когда включены N- или C-концевые удлинения. Кроме того, CDR, содержащие связывающие домены, могут быть спарены с различными партнерскими цепями, такими как общие с другим антителом. При совместном использовании с так называемыми "общими" легкими или "общими" тяжелыми цепями указанные связывающие домены все еще могут функционировать. Кроме того, указанные связывающие домены могут функционировать при мультимеризации. Кроме того, "антитела или их фрагменты" могут также включать функциональные варианты, в которых VH или VL, или константные домены были модифицированы в сторону или в сторону другой канонической последовательности (например, как указано на IMGT.org) и которые все еще функционируют.

В целях сравнения двух тесно связанных полипептидных последовательностей "% идентичности последовательности" между первой полипептидной последовательностью и второй полипептидной последовательностью можно рассчитать с использованием NCBI BLAST v2.0, используя стандартные настройки для полипептидных последовательностей (BLASTP). В целях сравнения двух тесно связанных

полинуклеотидных последовательностей "% идентичности последовательности" между первой нуклеотидной последовательностью и второй нуклеотидной последовательностью можно рассчитать с использованием NCBI BLAST v2.0, используя стандартные настройки для нуклеотидных последовательностей (BLASTN).

Полипептидные или полинуклеотидные последовательности считаются такими же или "идентичными" другим полипептидным или полинуклеотидным последовательностям, если они имеют 100% идентичность последовательностей по всей своей длине. Остатки в последовательностях пронумерованы слева направо, то есть от N- до С-конца для полипептидов; от 5' до 3' конца для полинуклеотидов.

"Различие" между последовательностями относится к вставке, делеции или замене одного аминокислотного остатка в положении второй последовательности по сравнению с первой последовательностью. Две полипептидные последовательности могут содержать одно, два или более таких аминокислотных различий. Вставки, делеции или замены во второй последовательности, которая в остальном идентична (100% идентичность последовательности) первой последовательности, приводит к снижению % идентичности последовательностей. Например, если идентичные последовательности имеют длину 9 аминокислотных остатков, одна замена во второй последовательности приводит к идентичности последовательностей 88,9%. Если первая и вторая полипептидные последовательности имеют длину 9 аминокислотных остатков и имеют 6 идентичных остатков, первая и вторая полипептидные последовательности имеют идентичность более 66% (идентичность первой и второй полипептидных последовательностей составляет 66,7%).

Альтернативно, для целей сравнения первой эталонной полипептидной последовательности со второй сравниваемой полипептидной последовательностью может быть установлено количество добавлений, замен и/или удалений, выполненных в первой последовательности для получения второй последовательности. "Добавление" представляет собой добавление одного аминокислотного остатка в последовательность первого полипептида (включая добавление на любом конце первого полипептида). "Замена" представляет собой замену одного аминокислотного остатка в последовательности первого полипептида на один другой аминокислотный остаток. Указанная замена может быть консервативной или неконсервативной. "Делеция" представляет собой делецию одного аминокислотного остатка из последовательности первого полипептида (включая делецию на любом конце первого полипептида).

"Консервативная" аминокислотная замена представляет собой аминокислотную замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком аналогичной химической структуры и которая, как ожидается, будет иметь небольшое влияние на функцию, активность или другие биологические свойства полипептида. Подходящими такими консервативными заменами являются замены, при которых одна аминокислота в следующих группах заменена другим аминокислотным остатком из той же группы:

Группа	Аминокислотный остаток
Неполярная алифатическая	Глицин
	Аланин
	Валин
	Метионин
	Лейцин
	Изолейцин
Ароматическая	Фенилаланин
	Тирозин
	Триптофан
Полярная незаряженная	Серин
	Треонин
	Цистеин
	Пролин
	Аспарагин
	Глутамин
Отрицательно заряженная	Аспаргат
	Глутамат
Положительно заряженная	Лизин
	Аргинин
	Гистидин

Соответственно, гидрофобный аминокислотный остаток представляет собой неполярную аминокислоту.

кислоту. Более предпочтительно, гидрофобный аминокислотный остаток выбран из V, I, L, M, F, W или C.

Используемая в данном документе нумерация полипептидных последовательностей и определения CDR и FR соответствуют определению в системе Kabat (Kabat et al., 1991, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки). "Соответствующий" аминокислотный остаток между первой и второй полипептидной последовательностью представляет собой аминокислотный остаток в первой аффинной последовательности, который находится в одном и том же положении согласно системе Кабата с аминокислотным остатком во второй последовательности, в то время как аминокислотный остаток во второй последовательности может отличаться по идентичности от первой. Соответственно соответствующие остатки будут иметь одинаковый номер (и букву), если каркас и CDR имеют одинаковую длину согласно определению Кабата. Выравнивание может быть достигнуто вручную или с использованием, например, известного компьютерного алгоритма выравнивания последовательностей, такого как NCBI BLAST v2.0 (BLASTP или BLASTN), с использованием стандартных настроек.

Ссылки в данном документе на "эпитоп" относятся к части мишени, которая специфически связывается антителом или его фрагментом. Эпитопы также могут называться "антигенными детерминантами". Антитело связывает "по существу тот же эпитоп", что и другое антитело, когда они оба распознают идентичные или пространственно перекрывающиеся эпитопы. Обычно используемые методы определения того, связываются ли два антитела с идентичными или перекрывающимися эпитопами, представляют собой конкурентные анализы, которые могут быть настроены в различных форматах (например, луночные планшеты с использованием радиоактивных или ферментных меток, или проточная цитометрия на антиген-экспрессирующих клетках) с использованием либо меченых антиген или меченое антитело.

Эпитопы, обнаруженные на белках-мишенях, можно определить как "линейные эпитопы" или "конформационные эпитопы". Линейные эпитопы образованы непрерывной последовательностью аминокислот в белковом антигене. Конформационные эпитопы образуются из аминокислот, которые не являются непрерывными в последовательности белка, но которые собираются вместе при сворачивании белка в его трехмерную структуру.

Используемый в данном документе термин "вектор" предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Одним из типов вектора является "плаزمид", которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный источник репликации, и эписомальные векторы млекопитающих и дрожжей). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе "рекомбинантными векторами экспрессии" (или просто "векторами экспрессии"). В общем, векторы экспрессии, применимые в методиках рекомбинантной ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании термины "плазмид" и "вектор" могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазмид является наиболее часто используемой формой вектора. Однако изобретение предназначено для включения таких других форм векторов экспрессии, таких как вирусные векторы (например, ретровирусы с дефектом репликации, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции, а также системы бактериофагов и фагмид. Используемый в данном документе термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") предназначен для обозначения клетки, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Такие термины предназначены для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но и потомства такой клетки, например, когда указанное потомство используется для создания клеточной линии или банка клеток, которые затем необязательно хранятся, предоставляются, продаются, передаются или используются для производства антитела или его фрагмента, как описано в данном документе.

Ссылки на "субъект", "пациент" или "индивидуум" относятся к субъекту, в частности, к млекопитающему, подлежащему лечению. Субъекты-млекопитающие включают людей, приматов, сельскохозяйственных животных (таких как коровы), спортивных животных или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы или мыши. В некоторых вариантах реализации субъектом является человек. В альтернативных вариантах реализации субъектом является млекопитающее, не относящееся к человеку, такое как мышь.

Термин "достаточное количество" означает количество, достаточное для получения желаемого эффекта. Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество, которое эффективно для облегчения симптома заболевания или расстройства. Терапевтически эффективное количество может быть "профилактически эффективным количеством", поскольку профилактика может считаться терапией.

Заболевание или расстройство "облегчается", если снижается тяжесть признака или симптома заболевания, или расстройства, частота, с которой субъект испытывает такой признак или симптом, или и то, и другое.

Используемый в данном документе термин "лечение заболевания или расстройства" означает снижение частоты и/или тяжести по меньшей мере одного признака или симптома заболевания, или расстройства, испытываемого субъектом.

"Онкологическое заболевание" в контексте настоящего описания относится к аномальному росту или делению клеток. Как правило, рост и/или продолжительность жизни раковой клетки превышают и не координируются с ростом нормальных клеток и окружающих ее тканей. Онкологическое заболевание может быть доброкачественным, предзлокачественным или злокачественным. Онкологическое заболевание возникает в различных клетках и тканях, включая ротовую полость (например, рот, язык, глотку и т.д.), пищеварительную систему (например, пищевод, желудок, тонкий кишечник, толстую кишку, прямую кишку, печень, желчный проток, желчный пузырь, поджелудочную железу и т.д.), дыхательную систему (например, гортань, легки, бронхи и т.д.), кости, суставы, кожи (например, базальные клетки, плоскоклеточные клетки, менингиомы и т.д.), грудь, половую систему (например, матка, яичник, простата, яички и т.д.), мочевыделительную систему (например, мочевой пузырь, почки, мочеточник и т.д.), глаза, нервную систему (например, мозг и т.д.), эндокринную систему (например, щитовидную железу и т.д.) и кровеносную систему (например, лимфому, миелому, лейкоз, лейкоз, острый лимфолейкоз, хронический лимфолейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и т.д.).

Используемый в данном документе термин "около" при использовании в данном документе включает до 10% включительно и до 10% ниже указанного значения, предпочтительно до 5% включительно и до 5% включительно ниже указанного значения, особенно указанное значение. Термин "между" включает значения указанных границ.

Антитела или их фрагменты

В настоящем документе предусмотрены антитела или их фрагменты, способные специфически связываться с дельта-вариабельной цепью 1 (V δ 1) $\gamma\delta$ T-клеточного рецептора (TCR). Данное изобретение относится к применению указанных антител в качестве лекарственных средств для введения субъекту, подлежащему лечению.

В одном варианте реализации антитело или его фрагмент представляет собой scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, вариабельный домен (например, VH или VL), диатело, мини-тело или моноклональное антитело. В другом варианте реализации антитело или его фрагмент представляет собой scFv.

Антитела по данному изобретению могут относиться к любому классу, например, IgG, IgA, IgM, IgE, IgD или их изотипам, и могут содержать легкую цепь каппа или лямбда. В одном варианте реализации антитело представляет собой антитело IgG, например, по меньшей мере одного из изотипов, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В другом варианте реализации антитело может быть в формате, таком как формат IgG, который был модифицирован для придания желаемых свойств, таких как наличие мутации Fc для снижения эффекторной функции, увеличения периода полужизни, изменения ADCC или повышения стабильности шарнира. Такие модификации хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте реализации антитело или его фрагмент принадлежит человеку. Таким образом, антитело или его фрагмент могут происходить из последовательности иммуноглобулина человека (Ig). CDR, каркасная и/или константная область антитела (или его фрагмента) могут происходить из последовательности Ig человека, в частности последовательности Ig человека. CDR, каркасная область и/или константная область могут быть по существу идентичными для последовательности Ig человека, в частности последовательности Ig человека. Преимущество использования антител человека состоит в том, что они обладают низким уровнем иммуногенности или не обладают иммуногенностью у человека.

Антитело или его фрагмент также могут быть химерными, например, химерными антителами мыши и человека.

Альтернативно, антитело или его фрагмент происходит от не относящихся к человеку видов, таких как мышь. Такие нечеловеческие антитела можно модифицировать для увеличения их сходства с вариантами антител, вырабатываемых естественным образом у людей, таким образом, антитело или его фрагмент могут быть частично или полностью гуманизированы. Следовательно, в одном варианте реализации антитело или его фрагмент являются гуманизированными.

Последовательности антител

Выделенные антитела к V δ 1 или их фрагменты по данному изобретению могут быть описаны со ссылкой на их последовательности CDR.

Согласно одному аспекту данного изобретения предлагается выделенное антитело к V δ 1 или его фрагмент, которое включает одно или более из:

CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: A1-A12; и/или

CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38-61.

Согласно одному аспекту данного изобретения предлагается выделенное антитело к V δ 1 или его

заменами и/или делециями. В одном варианте реализации последовательность может включать до пяти аминокислотных замен, например, до трех аминокислотных замен, в частности, до двух аминокислотных замен. В другом варианте реализации последовательность может содержать до пяти аминокислотных замен, например, до трех аминокислотных замен, в частности, до одной или двух аминокислотных замен. Например, CDR3 антитела или его фрагмента по данному изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 2, более предпочтительно не более 1 замены(замен) по сравнению с любой из SEQ ID NO: 2-25.

Приемлемо любые остатки CDR1, CDR2 или CDR3, отличающиеся от их соответствующих остатков в SEQ ID NO: 2-61 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: A1-A12 представляют собой консервативные замены по отношению к их соответствующим остаткам. Например, любые остатки CDR3, отличающиеся от их соответствующих остатков в SEQ ID NO: 2-25 представляют собой консервативные замены по отношению к их соответствующим остаткам.

В одном варианте реализации антитело или его фрагмент содержит:

- (i) область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 2-13;
- (ii) область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26-37;
- (iii) область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38-49;
- (iv) область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 14-25;
- (v) область VL, содержащую CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: A1-A12; и/или
- (vi) область VL, содержащую CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 50-61.

В одном варианте реализации антитело или его фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую:

- (i) область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 2-13;
- (ii) область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26-37; и
- (iii) область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38-49.

В одном варианте реализации антитело или его фрагмент содержит легкую цепь, содержащую:

- (i) область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 14-25;
- (ii) область VL, содержащую CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12; и
- (iii) область VL, содержащую CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 50-61.

В одном варианте реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из) область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 или 6, например, 2, 3, 4 или 5, в частности 2, 3 или 4. В одном варианте реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из) область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29 или 30, например, 26, 27, 28 или 29, в частности 26, 27 или 28. В одном варианте реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из) область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41 или 42, например, 38, 39, 40 или 41, в частности 38, 39 или 40.

В одном варианте реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из) область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11. В одном варианте реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из) область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 32, 33, 34 или 35. В одном варианте реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из) область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 44, 45, 46 или 47.

В одном варианте реализации область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 2, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 26 и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 38. В одном варианте реализации CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 26 и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 38.

В одном варианте реализации область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 27 и CDR1, содержащую последовательность

довательность SEQ ID NO: 61. В одном варианте реализации HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 13, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 37, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 49, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 25, LCDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: A12 и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 61.

В одном варианте реализации антители или его фрагмент содержит одну или более последовательностей CDR, как описано в табл. 2. В другом варианте реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (таких как все) последовательностей CDR клона 1252_P01_C08, как описано в табл. 2. В альтернативном варианте реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (таких как все) последовательностей CDR клона 1245_P01_E07, как описано в табл. 2. В альтернативном варианте реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (таких как все) последовательностей CDR клона 1245_P02_G04, как описано в табл. 2. В альтернативном варианте реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (таких как все) последовательностей CDR клона 1245_P02_B07, как описано в табл. 2. В альтернативном варианте реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (таких как все) последовательностей CDR клона 1251_P02_C05, как описано в табл. 2. В альтернативном варианте реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (таких как все) последовательностей CDR клона 1139_P01_E04, как описано в табл. 2. В альтернативном варианте реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (таких как все) последовательностей CDR клона 1245_P02_F07, как описано в табл. 2. В альтернативном варианте реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (таких как все) последовательностей CDR клона 1245_P01_G06, как описано в табл. 2. В альтернативном варианте реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (таких как все) последовательностей CDR клона 1245_P01_G09, как описано в табл. 2. В альтернативном варианте реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (таких как все) последовательностей CDR клона 1138_P01_B09, как описано в табл. 2. В альтернативном варианте реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (таких как все) последовательностей CDR клона 1251_P02_G10, как описано в табл. 2.

Соответственно, каждая из указанных выше областей VH и VL содержит четыре каркасных области (FR1-FR4). В одном варианте реализации антители или его фрагмент содержит каркасную область (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% каркасной области любой из SEQ ID NO: 62-85. В одном варианте реализации антители или его фрагмент содержит каркасную область (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, 97% или 99% каркасной области любой из SEQ ID NO: 62-85. В одном варианте реализации, антители или его фрагмент содержит каркасную область (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 62-85. В одном варианте реализации, антители или его фрагмент содержит каркасную область (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), состоящую из последовательности любой из SEQ ID NO: 62-85.

Описанные в данном документе антители можно определить по их переменным последовательностям полной легкой цепи и/или тяжелой цепи. Следовательно, в соответствии с дополнительным аспектом данного изобретения предлагается выделенное антители к V δ 1 или его фрагмент, которое содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 62-85. Согласно дополнительному аспекту данного изобретения предлагается выделенное антители к V δ 1 или его фрагмент, которое содержит CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 62-85.

В одном варианте реализации, антители или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 62-73. В одном варианте реализации, антители или его фрагмент содержит область VH, состоящую из аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 62-73. В дополнительном варианте реализации, область VH содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65 или 66, такой как 62, 63, 64 или 65, в частности 62, 63 или 64. В дополнительном варианте реализации, область VH состоит из аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65 или 66, такой как 62, 63, 64 или 65, в частности 62, 63 или 64. В дополнительном варианте реализации, область VH содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 или 73, такой как 68, 69, 70 или 71. В дополнительном варианте реализации, область VH состоит из аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 или 73, такой как 68, 69, 70 или 71.

В одном варианте реализации, антители или его фрагмент содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 74-85. В одном варианте реализации, антители или его фрагмент содержит область VL, состоящую из аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 80% последователь-

вательность SEQ ID NO: 93 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте реализации, антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте реализации, антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95 (1245_P01_G09).

В одном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 86-97. В дополнительном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 86-97. В еще одном дополнительном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 87 (1252_P01_C08). В альтернативном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86 (1245_P01_E07). В альтернативном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88 (1245_P02_G04). В альтернативном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92 (1139_P01_E04). В альтернативном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 94 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95 (1245_P01_G09).

Специалисту в данной области техники будет понятно, что конструкции scFv могут быть сконструированы и получены с учетом модификаций N-конца и C-конца, чтобы способствовать трансляции, очистке и обнаружению. Например, на N-конце последовательности scFv может быть включен дополнительный аминокислотный остаток метионина и/или аланина перед каноническими последовательностями VH (например, начальный QVQ или EVQ). На C-конце (т.е. на C-конце канонической последовательности домена VL, заканчивающейся согласно определению IMGT) могут быть включены дополнительные последовательности, такие как (i) частичная последовательность константного домена и/или (ii) дополнительные синтетические последовательности, включая теги, такие как His-теги и Flag-теги, чтобы помочь с очисткой и обнаружением. В одном варианте реализации, SEQ ID NO: 124 добавлена к C-концу любой из SEQ ID NO: 86, 88-90, 92-97. В одном варианте реализации, SEQ ID NO: 125 добавлена к C-концу любой из SEQ ID NO: 86, 88-90, 92-97. В одном варианте реализации, SEQ ID NO: 126 добавлена к C-концу любой из SEQ ID NO: 87 или 91. В одном варианте реализации, SEQ ID NO: 127 добавлена к C-концу любой из SEQ ID NO: 87 или 91. Понятно, что указанные N- или C-концевые последовательности scFv являются необязательными и могут быть удалены, модифицированы или заменены, если приняты альтернативные стратегии дизайна, трансляции, очистки или обнаружения scFv.

Как описано в данном документе, антитела могут быть в любом формате. В предпочтительном варианте реализации антитело находится в формате IgG1. Следовательно, в одном варианте реализации, антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 111-122. В дополнительном варианте реализации, антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 111-122. В еще одном дополнительном варианте реализации, антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111-116, такой как SEQ ID NO: 111-113 и 116. В еще одном дополнительном варианте реализации, антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117-122, такой как SEQ ID NO: 117-120. В еще одном дополнительном варианте реализации, антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, 112, 116-120, такой как SEQ ID NO: 111, 112 или 116, или SEQ ID NO: 117-120.

В одном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 111-122. В дополнительном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 111-122. В еще одном дополнительном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111-116, такой как SEQ ID NO: 111-113 и 116. В еще одном дополнительном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117-122, такой как SEQ ID NO: 117-120. В еще одном дополнительном варианте реализации, антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111, 112, 116-120, такой как SEQ ID NO: 111, 112 или 116, или SEQ ID NO: 117-120.

В одном варианте реализации антитело связывается с тем же или по существу с тем же эпитопом, что и антитело или его фрагмент, как определено в данном документе, или конкурирует с ним. С помощью стандартных методов, известных в данной области техники, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к V δ 1, или конкурирует с ним за связывание. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к V δ 1 по данному изобретению, эталонному антителу позволяют связываться с белком или пептидом V δ 1 в условиях насыщения. Затем оценивается способность тестируемого антитела связывать-

ся с цепью V δ 1. Если тестируемое антитело способно связываться с V δ 1 после насыщения связывания с эталонным антителом к V δ 1, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антитело к δ 1. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с цепью V δ 1 после связывания насыщения с эталонным антителом к V δ 1, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный эталонным антителом к V δ 1 по данному изобретению.

Данное изобретение также включает антитела к V δ 1, которые конкурируют за связывание с V δ 1 с антителом или его фрагментом, как определено в данном документе, или антителом, имеющим последовательности CDR любого из типовых антител, описанных в данном документе. Например, конкурентные анализы можно проводить с антителом по данному изобретению, чтобы определить, какие белки, антитела и другие антагонисты конкурируют за связывание с цепью V δ 1 с антителом по данному изобретению и/или разделяют эпитоп. Эти анализы хорошо известны специалистам в данной области техники; они оценивают конкуренцию между антагонистами или лигандами за ограниченное количество сайтов связывания на белке, например, V δ 1. Антитело (или его фрагмент) иммобилизуют или переводят в нерастворимую форму до или после конкурентного анализа, и образец, связанный с цепью V δ 1, отделяют от несвязанного образца, например, декантированием (если антитело было предварительно переведено в нерастворимую форму) или центрифугированием (где антитело осаждали после конкурирующей реакции). Кроме того, конкурентное связывание можно определить по тому, изменена ли функция из-за связывания или отсутствия связывания антитела с белком, например, ингибирует ли молекула антитела или усиливает ферментативную активность, например, метки. Могут использоваться ИФА и другие функциональные анализы, известные в данной области техники и описанные в данном документе.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном-мишенью. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, как измерено с помощью конкурентно-связывающего анализа. Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если практически все аминокислотные мутации в антигене-мишени, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Затем можно провести дополнительные рутинные эксперименты (например, анализ мутации пептидов и связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела связано со связыванием с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или если стерическое блокирование (или другое явление) несет ответственность за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ИФА, РИА, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент содержат модифицированную эффекторную функцию за счет изменения Сахаров, связанных с Asn 297 (схема нумерации по Кабат). В дополнительной указанной модификации Asn 297 не фукозилирован или проявляет пониженное фукозилирование (т.е. дефукозилированное антитело или нефукозилированное антитело). Фукозилирование включает добавление сахара фукозы к молекуле, например, присоединение фукозы к N-гликанам, O-гликанам и гликолипидам. Соответственно, в дефукозилированном антителе фукоза не присоединяется к углеводным цепям константной области. Антитело можно модифицировать для предотвращения или ингибирования фукозилирования антитела. Обычно модификации гликозилирования включают экспрессию указанного антитела или его фрагмента в клетке-хозяине, обладающей альтернативными способностями процессинга гликозилирования, либо посредством направленной инженерии, либо посредством направленного или случайного отбора хозяина или клона (например, см. Пример 13). Эти и другие модификации эффекторов дополнительно обсуждаются в недавних обзорах, таких как Xinhua Wang et al. (2018) *Protein & Cell* 9: 63-73 и Pereira et al. (2018) *mAbs* 10(5): 693-711, включенные в данный документ.

Модификации последовательностей антител Антитела и их фрагменты можно модифицировать известными методами. Специалисты в данной области могут легко включить модификации последовательностей в молекулы антител, описанные в данном документе. Следующие ниже примеры не являются ограничивающими.

Во время обнаружения антител и восстановления последовательности из фаговых библиотек желаемые переменные домены антител можно переформатировать в полноразмерное IgG путем субклонирования. Для ускорения процесса переменные домены часто переносятся с помощью рестрикционных ферментов. Эти уникальные сайты рестрикции могут вводить дополнительные/альтернативные аминокислоты и отличаться от канонической последовательности (такие канонические последовательности можно найти, например, в международной информационной системе ImMunoGeneTics [IMGT], см. [Http://www.imgt.org](http://www.imgt.org)). Они могут быть введены как модификации последовательностей легкой цепи каппа или лямбда.

Модификации легкой цепи каппа

Вариабельные последовательности вариабельной легкой цепи каппа можно клонировать с использованием сайтов рестрикции (например, NheI-NotI) во время переформатирования в полноразмерное IgG. Более конкретно, на N-конце легкой цепи каппа была введена дополнительная последовательность Ala-Ser для поддержки клонирования. Предпочтительно эта дополнительная последовательность AS затем удаляется во время дальнейшей разработки, чтобы сгенерировать каноническую N-концевую последовательность. Следовательно, в одном варианте реализации, описанные в данном документе антитела, содержащие легкую каппа-цепь, не содержат AS-последовательность на своих N-концах, то есть SEQ ID NO: 74, 76-78 и 80-85 не содержат исходную последовательность AS. В дополнительном варианте реализации, SEQ ID NO: 74 и 76-78 не содержат исходную последовательность AS. Следует понимать, что этот вариант реализации также применяется к другим последовательностям, включенным в данный документ, которые содержат эту последовательность (например, SEQ ID NO: 86, 88-90 и 92-97).

Для поддержки клонирования могут быть внесены дополнительные изменения аминокислот. Например, для описанных в данном документе антител на границе вариабельного домена/константного домена легкой цепи каппа была введена замена валина на аланин для поддержки клонирования. Это привело к модификации константного домена каппа. В частности, это приводит к тому, что постоянный домен начинается RTAAAPS (с сайта ограничения NotI). Предпочтительно эта последовательность может быть модифицирована во время дальнейшей разработки для создания канонических константных областей легкой цепи каппа, которые начинаются с RTVAAPS.

Следовательно, в одном варианте реализации, описанные в данном документе антитела, содержащие легкую каппа-цепь, содержат константный домен, начинающийся с последовательности RTV. Следовательно, в одном варианте реализации последовательность RTAAAPS из SEQ ID NO: 111-114 и 117-122 заменяется последовательностью RTVAAPS. Например, см. Пример 13 и SEQ ID NO: 129, 130.

Модификации легкой цепи лямбда

Подобно приведенному выше примеру каппа, вариабельные домены легкой цепи лямбда также можно клонировать путем введения сайтов рестрикции (например, NheI-NotI) во время переформатирования в полноразмерное IgG. Более конкретно, на N-конце легкой цепи лямбда может быть введена дополнительная последовательность Ala-Ser для поддержки клонирования. Предпочтительно эта дополнительная последовательность AS затем удаляется во время дальнейшей разработки, чтобы сгенерировать каноническую N-концевую последовательность. Следовательно, в одном варианте реализации, описанные в данном документе антитела, содержащие легкую лямбда-цепь, не содержат AS-последовательность на своем N-конце, то есть SEQ ID NO: 75 и 79 не содержат исходную последовательность AS. Следует понимать, что этот вариант реализации также применяется к другим последовательностям, включенным в данный документ, которые содержат эту последовательность (например, SEQ ID NO: 87, 91, 115 и 116). В одном варианте реализации, SEQ ID NO: 75 не содержит первых шести остатков, т.е. последовательность ASSYEL удалена.

В качестве другого примера, для описанных в данном документе антител на границе вариабельного домена/константного домена лямбда-легкой цепи было внесено изменение последовательности лизина на аланин для поддержки клонирования. Это привело к модификации константной области лямбда. В частности, это приводит к константному домену, начинающемуся с GQPAAPS (с сайта ограничения NotI). Предпочтительно, эта последовательность может быть изменена во время дальнейшего развития, например, для создания канонической константной области легкой цепи лямбда, которая запускает GQPKAAPS.

Следовательно, в одном варианте реализации, описанные в данном документе антитела, содержащие легкую цепь лямбда, содержат константный домен, начинающийся с последовательности GQPK. Следовательно, в одном варианте реализации последовательность GQPAAPS из SEQ ID NO: 115 или 116 заменяется последовательностью GQPKAAPS.

Модификации тяжелых цепей

Обычно последовательности вариабельной тяжелой цепи человека начинаются либо с основного глутамин (Q), либо с кислого глутамата (E). Однако известно, что обе такие последовательности превращаются в кислый аминокислотный остаток, пироглутамат (pE). Преобразование Q в pE приводит к изменению заряда антитела, в то время как преобразование E в pE не изменяет заряд антитела. Следовательно, чтобы избежать вариабельного изменения заряда с течением времени, одним из вариантов является изменение исходной последовательности тяжелой цепи с Q на E в первом случае. Следовательно, в одном варианте реализации тяжелая цепь антитела, описанного в данном документе, содержит модификацию с Q на E на N-конце. В частности, исходный остаток SEQ ID NO: 62, 64 и/или 67-71 могут быть изменены с Q на E. Следует понимать, что этот вариант реализации также применим к другим последовательностям, включенным в данный документ, которые содержат эту последовательность (например, SEQ ID NO: 86, 88, 91-97 и 111, 112, 115, 117-120). Например, см. Пример 13 и SEQ ID NO: 129, 130.

Кроме того, C-конец константного домена IgG1 заканчивается PGK. Однако концевой основной лизин (K) часто расщепляется во время экспрессии (например, в клетках CHO). Это, в свою очередь, приводит к изменению заряда антитела за счет различной потери C-концевого остатка лизина. Следовательно, одним из вариантов является удаление лизина в первом случае, что приводит к однородной и согла-

сованной С-концевой последовательности тяжелой цепи, оканчивающейся на PG. Следовательно, в одном варианте реализации тяжелая цепь антитела, описанного в данном документе, имеет конец K, удаленный от его С-конца. В частности, антитело по данному изобретению может содержать любую из SEQ ID NO: 111-122, где удален концевой остаток лизина. Например, см. SEQ ID NO: 141.

Необязательные модификации аллотипа

Во время открытия антител можно использовать конкретные аллотипы человека. Необязательно, антитела можно переключить на разные аллотипы человека во время развития. В качестве неограничивающего примера для каппа-цепи существует три аллотипа человека, обозначенных Km1, Km1,2 и Km3, которые определяют три аллеля Km (с использованием нумерации аллотипов): Km1 коррелирует с валином 153 (IMGT V45.1) и лейцином 191 (IMGT L101); Km1,2 коррелирует с аланином 153 (IMGT A45.1) и лейцином 191 (IMGT L101); а Km3 коррелирует с аланином 153 (IMGT A45.1) и валином 191 (IMGT V101). Необязательно, поэтому можно изменить последовательность с одного аллотипа на другой с помощью стандартных подходов к клонированию. Например, изменение L191V (IMGT L101V) преобразует аллотип Km1,2 в аллотип Km3. Дополнительные ссылки на такие аллотипы см. Jefferis and Lefranc (2009) MAbs 1 (4): 332-8, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Следовательно, в одном варианте реализации описанное в данном документе антитело содержит аминокислотные замены, происходящие от другого аллотипа человека того же гена. В другом варианте реализации антитело содержит замену L191V (IMGT L101V) в каппа-цепи для преобразования с-домена из km1,2 в аллотип km3. Например, см. пример 13 и SEQ ID NO: 129, 130.

Антитела, нацеленные на эпитопы

В настоящем документе предложены антитела (или их фрагменты), которые связываются с эпитопом цепи V δ 1 $\gamma\delta$ TCR. Такое связывание может необязательно оказывать влияние на активность $\gamma\delta$ TCR, например, активацию или ингибирование.

В одном варианте реализации эпитоп может быть активирующим эпитопом $\gamma\delta$ Т-клетки. "Активирующий" эпитоп может включать, например, стимуляцию функции TCR, такую как дегрануляция клеток, подавление TCR, цитотоксичность, пролиферация, мобилизация, повышенная выживаемость или устойчивость к истощению, внутриклеточная передача сигналов, секреция цитокинов или факторов роста, фенотипические изменения или изменение экспрессии генов. Например, связывание активирующего эпитопа может стимулировать экспансию (т.е. пролиферацию) популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, предпочтительно популяции V δ 1+ Т-клеток. Соответственно, эти антитела можно использовать для модуляции активации $\gamma\delta$ Т-клеток и, таким образом, для модулирования иммунного ответа. Следовательно, в одном варианте связывание активирующего эпитопа подавляет $\gamma\delta$ TCR. В дополнительном или альтернативном варианте реализации связывание активирующего эпитопа активирует дегрануляцию $\gamma\delta$ Т-клетки. В другом дополнительном или альтернативном варианте реализации связывание активирующего эпитопа активирует уничтожение $\gamma\delta$ Т-клеток.

Альтернативно, антитела (или их фрагменты) могут оказывать блокирующее действие путем предотвращения связывания или взаимодействия другого антитела или молекулы. В одном варианте реализации в данном изобретении предлагаются выделенные антитела или их фрагменты, которые блокируют V δ 1 и предотвращают связывание TCR (например, посредством стерических затруднений). Блокируя V δ 1, антитело может предотвращать активацию и/или передачу сигналов TCR. Эпитоп может быть ингибирующим эпитопом $\gamma\delta$ Т-клетки. "Ингибирующий" эпитоп может включать, например, блокирование функции TCR, тем самым ингибируя активацию TCR.

В одном варианте реализации данное изобретение относится к выделенным антителам или их фрагментам, которые связываются с V δ 1, но не активируют $\gamma\delta$ Т-клетки (т.е. неактивирующее, не ингибирующее или нейтральное связывающее антитело или его фрагмент) и не предотвращают TCR связывание, например, через его "частный" паратроп, кодируемый CDR3. Связываясь с V δ 1, но не ингибируя или не активируя активность $\gamma\delta$ Т-клеток, нейтральное связывающее антитело или его фрагмент можно использовать в некоторых вариантах реализации для совместной локализации другой молекулы. Например, нейтрально связывающееся антитело V δ 1 может быть конъюгировано с терапевтическим компонентом, таким как цитотоксин или химиотерапевтический агент. Такие конъюгаты могут называться иммуноконъюгатами. Антитело может быть связано с цитотоксином, радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, токсином, пептидом или терапевтическим агентом в любом месте молекулы, если оно способно связывать свою мишень. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитело-лекарственное средство и слитые белки антитело-токсин. В одном варианте реализации агент может представлять собой второе антитело, отличное от V δ 1. В некоторых вариантах реализации антитело может быть конъюгировано с агентом, специфичным для опухолевой клетки или инфицированной вирусом клетки. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом к V δ 1, будет учитывать состояние, которое необходимо лечить, и желаемый терапевтический эффект, который должен быть достигнут. В одном варианте реализации агент может представлять собой второе антитело или его фрагмент, которое связывается с молекулой, отличной от V δ 1.

Эпитоп предпочтительно состоит по меньшей мере из одной внеклеточной, растворимой, гидрофильной, внешней или цитоплазматической части цепи V δ 1 $\gamma\delta$ TCR.

В частности, эпитоп не содержит эпитоп, обнаруженного в гипервариабельной области цепи V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, в частности CDR3 цепи V δ 1. В предпочтительном варианте реализации эпитоп находится в невариабельной области цепи V δ 1 $\gamma\delta$ TCR. Следует принять во внимание, что такое связывание обеспечивает уникальное распознавание цепи V δ 1 без ограничения последовательностей TCR, которые сильно изменчивы (в частности, CDR3). Различные комплексы $\gamma\delta$ TCR, которые распознают МНС-подобные пептиды или антиген, могут быть распознаны таким образом только по присутствию цепи V δ 1. Таким образом, следует понимать, что любой $\gamma\delta$ TCR, содержащий цепь V δ 1, может быть распознан с использованием антител или их фрагментов, как определено в данном документе, независимо от специфичности $\gamma\delta$ TCR. В одном варианте реализации, эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 1-24 и/или 35-90 SEQ ID NO: 1, например, части цепи V δ 1, которые не являются частью последовательностей CDR1 и/или CDR3. В одном варианте реализации, эпитоп не содержит аминокислотных остатков в аминокислотной области 91-105 (CDR3) SEQ ID NO: 1.

Подобно хорошо охарактеризованным $\alpha\beta$ Т-клеткам, $\gamma\delta$ Т-клетки используют отдельный набор соматически перестроенных вариабельных (V), разнообразных (D), соединяющихся (J) и константных (C) генов, хотя $\gamma\delta$ Т-клетки содержат меньше V, D и J сегментов, чем $\alpha\beta$ Т-клетки. В одном варианте реализации эпитоп, связанный с антителами (или их фрагментами), не содержит эпитопа, обнаруженного в области J цепи V δ 1 (например, в одной из четырех областей J, кодируемых в зародышевой линии одноцепочечной дельта-цепи человека: SEQ ID NO: 152 (J1*0) или 153 (J2*0), или 154 (J3*0), или 155 (J4*0)) или в C-области цепи V δ 1 (например, SEQ ID NO: 156 (C1*0), который содержит C-концевые прилегающие/трансмембранные области). В одном варианте реализации эпитоп, связанный с антителами (или их фрагментами), не содержит эпитопа, обнаруженного в N-концевой лидерной последовательности цепи V δ 1 (например, SEQ ID NO: 150). Следовательно, антитело или фрагмент могут связываться только в V-области цепи V δ 1 (например, SEQ ID NO: 151). Таким образом, в одном варианте реализации эпитоп состоит из эпитопа в V-области $\gamma\delta$ TCR (например, аминокислотных остатков 1-90 SEQ ID NO: 1).

Ссылка на эпитоп сделана в отношении последовательности V δ 1, полученной из последовательности, описанной в Luoma et al. (2013) Immunity 39: 1032-1042 и записи банка данных структуры белков RCSB: 4MNH и 3OMZ, представленные как SEQ ID NO: 1:

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYIFWYKQLPSKEMIFLIRQGSDEQNA
KSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGESLTRADKLIFGKGTRVTVEPNIQ
NPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNNSA
VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESP (SEQ ID NO: 1)

SEQ ID NO: 1 представляет растворимый TCR, содержащий V-область (также называемую вариабельным доменом), D-область, J-область и константную область TCR. V-область содержит аминокислотные остатки 1-90, D-область содержит аминокислотные остатки 91-104, J-область содержит аминокислотные остатки 105-115 и константная область содержит аминокислотные остатки 116-209. В V-области CDR1 определяется как аминокислотные остатки 25-34 SEQ ID NO: 1 CDR2 определяется как аминокислотные остатки 50-54 SEQ ID NO: 1, а CDR3 определяется как аминокислотные остатки 93-104 SEQ ID NO: 1 (Xu et al., PNAS USA 108(6):2414-2419 (2011)).

Таким образом, согласно аспекту данного изобретения, предлагается выделенное антитело или его фрагмент, которое связывается с эпитопом вариабельной цепи дельта 1 (V δ 1) рецептора $\gamma\delta$ Т-клетки (TCR), содержащей один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях:

- (i) 3-20 SEQ ID NO: 1; и/или
- (ii) 37-77 SEQ ID NO: 1.

В дополнительном варианте реализации антитела или их фрагменты дополнительно распознают полиморфную V-область, содержащую аминокислотные остатки 1-90 эпитопа SEQ ID NO: 128. Следовательно, аминокислоты 1-90 SEQ ID NO: 1 и последовательность полиморфного варианта зародышевой линии (аминокислоты 1-90 SEQ ID NO: 128) могут считаться взаимозаменяемыми при определении эпитопов, описанных в данном документе. Представленные в данном документе исследования продемонстрировали, что антитела по данному изобретению могут распознавать оба варианта этой последовательности зародышевой линии. В качестве примера, когда указано, что антитела или их фрагменты, как определено в данном документе, распознают эпитопы, содержащие один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 1-24 и/или 35-90 SEQ ID NO: 1, что также относится к таким же областям SEQ ID NO: 128; конкретно аминокислотным областям 1-24 и/или 35-90 SEQ ID NO: 128.

В одном варианте реализации антитела или их фрагменты распознают один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 1-90 SEQ ID NO: 1 и эквивалентно расположенных аминокислот в областях 1-90 в SEQ ID NO: 128. Более конкретно, в одном варианте реализации антитела или их фрагменты, как определено в данном документе, распознают эпитоп зародышевой линии человека,

где указанная зародышевая линия кодирует либо аланин (A), либо валин (V) в положении 71 SEQ ID NO: 1.

В одном варианте реализации эпитоп содержит один или более, например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более аминокислотных остатков в описанных областях.

В другом варианте реализации эпитоп содержит один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 3-20 SEQ ID NO: 1. В альтернативном варианте реализации эпитоп содержит один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 37-77 SEQ ID NO: 1 (например, аминокислотной области 50-54). В еще одном варианте реализации эпитоп содержит один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 3-20 (например, 5-20 или 3-17) и один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 37-77 (например, 62-77 или 62-69) SEQ ID NO: 1.

Также будет понятно, что указанное антитело (или его фрагмент) не обязательно должно связываться со всеми аминокислотами в определенном диапазоне. Такие эпитопы могут называться линейными эпитопами. Например, антитело, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в аминокислотной области 5-20 SEQ ID NO: 1 может связываться только с одним или более аминокислотными остатками в указанном диапазоне, например, аминокислотные остатки на каждом конце диапазона (т.е. аминокислоты 5 и 20), необязательно включая аминокислоты в пределах диапазона (т.е. аминокислоты 5, 9, 16 и 20).

В одном варианте реализации, эпитоп содержит по меньшей мере один из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 1. В дополнительных вариантах реализации эпитоп содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 1.

В одном варианте реализации эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в следующих аминокислотных областях SEQ ID NO: 1 (или SEQ ID NO:128, как описано выше):

- (i) 3-17;
- (ii) 5-20;
- (iii) 37-53;
- (iv) 50-64;
- (v) 59-72;
- (vi) 59-77;
- (vii) 62-69; и/или
- (viii) 62-77.

В дополнительном варианте реализации, эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте реализации, эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

В дополнительном варианте реализации, эпитоп содержит аминокислотные остатки: 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68 и 69 SEQ ID NO: 1, или, соответственно, состоит из аминокислотных остатков: 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68 и 69 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте реализации, эпитоп содержит аминокислотные остатки: 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 1, или, соответственно, состоит из аминокислотных остатков: 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 1. В еще одном варианте реализации эпитоп содержит аминокислотные остатки: 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 1, или, соответственно, состоит из аминокислотных остатков: 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте реализации, эпитоп содержит аминокислотные остатки: 50, 53, 59, 62 и 64 SEQ ID NO: 1, или, соответственно, состоит из аминокислотных остатков: 50, 53, 59, 62 и 64 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте реализации, эпитоп содержит аминокислотные остатки: 59, 60, 68 и 72 SEQ ID NO: 1, или, соответственно, состоит из аминокислотных остатков: 59, 60, 68 и 72 SEQ ID NO: 1.

В одном варианте реализации, эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 5-20 и/или 62-77 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте реализации, эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 5-20 и 62-77 SEQ ID NO: 1. В другом альтернативном варианте реализации, эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 5-20 или 62-77 SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности 1245_P01_E07, или такие антитела или их фрагменты могут происходить из 1245_P01_E07. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR 1245_P01_E07 или одну, или обе последовательности VH и VL 1245_P01_E07, могут связываться с такими эпитопами.

В одном варианте реализации, эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотной области 50-64 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте реализации эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной области 50-64 SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности 1252_P01_C08, или такие антитела или их фрагменты могут происходить из 1252_P01_C08. Например,

антитела или их фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR 1252_P01_C08 или одну, или обе последовательности VH и VL 1252_P01_C08, могут связываться с такими эпитопами.

В одном варианте реализации, эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 37-53 и/или 59-77 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте реализации, эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 37-53 и 59-77 SEQ ID NO: 1. В другом альтернативном варианте реализации, эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 37-53 или 59-77 SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности 1245_P02_G04, или такие антитела или их фрагменты могут происходить из 1245_P02_G04. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR 1245_P02_G04 или одну, или обе последовательности VH и VL 1245_P02_G04, могут связываться с такими эпитопами.

В одном варианте реализации, эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотной области 59-72 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте реализации эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной области 59-72 SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности 1251_P02_C05, или такие антитела или их фрагменты могут происходить из 1251_P02_C05. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR 1251_P02_C05 или одну, или обе последовательности VH и VL 1251_P02_C05, могут связываться с такими эпитопами.

В одном варианте реализации эпитоп не содержит аминокислотных остатков в аминокислотной области 11-21 SEQ ID NO: 1. В одном варианте реализации, эпитоп не содержит аминокислотных остатков в аминокислотной области 21-28 SEQ ID NO: 1. В одном варианте реализации, эпитоп не содержит аминокислотных остатков в аминокислотной области 59 и 60 SEQ ID NO: 1. В одном варианте реализации, эпитоп не содержит аминокислотных остатков в аминокислотной области 67-82 SEQ ID NO: 1.

В одном варианте реализации эпитоп не является тем же эпитопом, который связывается коммерчески доступным антителом к V δ 1, таким как TS-1 или TS8.2. Как описано в WO2017197347, связывание TS-1 и TS8.2 с растворимыми TCR было обнаружено, когда цепь 81 включала последовательности V δ 1 J1 и V δ 1 J2, но не с цепью V δ 1 J3, что указывает на то, что во связывание TS-1 и TS8.2 вовлечены критические остатки в дельта J1 и дельта J2 области.

Ссылки на "в пределах" в данном документе включают границы диапазона определения. Например, "в пределах аминокислотных областей 5-20" относится ко всем аминокислотным остаткам, начиная с остатка 5 и включая остаток 20.

В данной области известны различные методы установления того, какой эпитоп связывается с антителом. Примеры методик включают, например, рутинные анализы перекрестного блокирования, мутационный анализ аланинового сканирования, пептидный блот-анализ, кристаллографические исследования анализа пептидного расщепления и анализ ЯМР. Кроме того, можно использовать такие методы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов. Другой метод, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, представляет собой водородно-дейтериевый обмен, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии (как описано в примере 9). В общих чертах, метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием интересующего белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносится в воду, и обмениваемые протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом антител, подвергаются обратному обмену между дейтерием и водородом с меньшей скоростью, чем обмениваемые протоны в аминокислотах, которые не являются частью интерфейса. В результате аминокислоты, которые образуют часть интерфейса белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, следовательно, проявлять относительно большую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в интерфейс. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело.

Связывание антител

Антитело или его фрагмент по данному изобретению может связываться с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, менее $1,5 \times 10^{-7}$ М (т.е. 150 нМ). В предпочтительном варианте реализации KD составляет менее $1,5 \times 10^{-7}$ М (т.е. 150 нМ). В другом варианте реализации KD составляет $1,3 \times 10^{-7}$ М (т.е. 130 нМ) или менее, например, $1,0 \times 10^{-7}$ М (т.е. 100 нМ) или менее. В еще одном варианте реализации KD составляет менее $5,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 50 нМ), например, менее $4,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 40 нМ), менее $3,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 30 нМ) или менее $2,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 20 нМ). Например, согласно некоторым аспектам предалается антитело к V δ 1 человека, которое связывается с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса менее $1,5 \times 10^{-7}$ М (т.е. 150 нМ).

В одном из аспектов данного изобретения предлагается антитело или его фрагмент, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса менее $4,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 40 нМ), менее $3,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 30 нМ) или менее

$2,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 20 нМ).

В одном варианте реализации аффинность связывания антитела или его фрагмента устанавливается путем покрытия антитела или его фрагмента прямо или косвенно (например, путем захвата с помощью Fc к IgG человека) на поверхности сенсора (например, аминокислотного чипа высокой емкости или эквивалента), где мишень, связанная с антителом или его фрагментом (т.е. цепь V δ 1 $\gamma\delta$ TCR), протекает через чип для обнаружения связывания. Соответственно, прибор MASS-2 (который также может называться Siegma SPR-32) используется при 25 °С в ФСБ + 0,02% рабочего буфера Твин 20 при 30 мкл/мин.

В данном документе описаны другие анализы, которые можно использовать для определения функции антитела. Например, описанное в данном документе антитело или его фрагмент можно оценить по взаимодействию $\gamma\delta$ TCR, например, измерение подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании антител. Экспрессия $\gamma\delta$ TCR на поверхности после нанесения антитела или его фрагмента (необязательно представленного на поверхности клетки) может быть измерена, например, методом проточной цитометрии. Описанное в данном документе антитело или его фрагмент можно также оценить путем измерения дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток. Например, экспрессия CD107a, маркера дегрануляции клеток, может быть измерена после нанесения антитела или его фрагмента (необязательно представленного на поверхности клетки) на $\gamma\delta$ Т-клетки, например, методом проточной цитометрии. Антитело или его фрагмент, описанные в данном документе, также можно оценить путем измерения активности уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток (чтобы проверить, влияет ли антитело на активность уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток). Например, клетки-мишени можно инкубировать с $\gamma\delta$ Т-клетками в присутствии антитела или его фрагмента (необязательно присутствующего на поверхности клетки). После инкубации культура может быть окрашена красителем для определения жизнеспособности клеток, чтобы различать живые и мертвые клетки-мишени. Затем можно измерить долю мертвых клеток, например, методом проточной цитометрии.

Лекарственные средства для модуляции $\gamma\delta$ Т-клеток

Антитела к V δ 1 или их фрагменты, как описано в данном документе, можно использовать для модуляции Т-клеток дельта-вариантной цепи (V δ 1) у пациента *in situ* (т.е. *in vivo*).

Модуляция Т-клеток V δ 1 может включать:

- экспансия Т-клеток V δ 1, например, путем избирательного увеличения количества Т-клеток V δ 1 или стимулирования выживания Т-клеток V δ 1;

- стимуляция Т-клеток V δ 1, например, за счет увеличения активности Т-клеток V δ 1, т.е. увеличения уничтожения клеток-мишеней;

- предотвращение истощения Т-клеток V δ 1, например, за счет увеличения стойкости Т-клеток V δ 1;

- дегрануляция Т-клеток V δ 1;

- иммуносупрессия Т-клеток V δ 1, например, путем подавления экспрессии V δ 1 TCR на клеточной поверхности, т.е. вызывая интернализацию V δ 1 TCR или снижая экспрессию белка V δ 1 TCR, или блокируя связывание V δ 1 TCR;

- уменьшение количества Т-клеток V δ 1, например, путем ингибирования пролиферации Т-клеток V δ 1 или индукции гибели Т-клеток V δ 1 (т.е. уничтожения Т-клеток V δ 1).

Лекарственные средства, которые модулируют маркеры иммунных клеток на клетках V δ 1+

Антитело или его фрагмент могут модулировать маркеры иммунных клеток V δ 1+ при введении пациенту.

Антитело или его фрагмент, описанные в данном документе, также можно оценить на предмет его пригодности для терапевтического применения путем измерения модуляции $\gamma\delta$ Т. Например, путем измерения изменения уровней CD25, CD69 или CD107a, присутствующих на V δ 1+ Т-клетке или клетках в модельной системе. Такие маркеры часто используются в качестве маркеров модуляции лимфоцитов (например, пролиферации или дегрануляции), и их можно измерить после применения антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, например, методом проточной цитометрии. Неожиданно во время таких оценок (например, см. Примеры 7, 17, 18) было обнаружено, что антитела, описанные в настоящем документе, придают заметно более высокие уровни CD25, или CD69, или CD107a Т-клеткам-мишеням V δ 1+. Необязательно, изменение фенотипа клетки V δ 1+ или ее популяции, протестированной в модельной системе, затем можно сравнить с изменением фенотипа при применении альтернативного антитела сравнения (например, ОКТ-3, TS8.2 и т.д.) к указанному эквиваленту $\gamma\delta$ Т-клетки.

Следовательно, в одном аспекте данного изобретения предоставляется способ оценки антитела или его фрагмента, которое связывается с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR для терапевтического использования, включающий введение антитела или его фрагмента в популяцию клеток, содержащую клетки V δ 1+, и определение влияния на уровень CD25, и/или CD69, и/или CD107a на поверхности клеток V δ 1+. Влияние на уровень CD25, CD69 и/или CD107a можно определять/измерять в течение определенного периода времени. Будет понятно, что эффект можно измерить по сравнению с уровнем CD25, и/или CD69, и/или CD107a на поверхности клетки V δ 1+, когда указанное антитело не применяется к указанной клетке в течение того же периода времени. В дополнительном аспекте данного изобретения предлагается способ

выбора, характеристики или сравнения антител, или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, путем добавления указанных антител к клеточной популяции, содержащей клетки V δ 1+, с последующим измерением уровня (или экспрессии) CD25, CD69 или CD107a на поверхности указанных клеток V δ 1+.

Лекарственные средства, которые изменяют ростовые свойства или количество клеток V δ 1+

Антитело или его фрагмент могут модулировать ростовые свойства клеток V δ 1+ при введении пациенту. Например, антитело или его фрагмент могут размножать клетки V δ 1+.

Альтернативный подход к измерению пролиферации $\gamma\delta$ T может включать измерение изменения относительного количества клеток V δ 1+ с течением времени при применении антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, для моделирования систем, содержащих указанные клетки. Неожиданно во время таких оценок было обнаружено, что описанные в данном документе антитела способны заметно увеличивать количество указанных V δ 1+ T-клеток (например, см. Примеры 10, 17 и 18), необязательно, это изменение количества затем можно сравнить с изменением числа, наблюдаемого при применении альтернативного антитела сравнения (например, анти-ОКТ3) к указанным модельным системам.

Следовательно, в другом аспекте данного изобретения предоставляется способ оценки антитела или его фрагмента, которое связывается с цепью V δ 1 TCR $\gamma\delta$, включающий введение антитела или его фрагмента в популяцию клеток, содержащую клетки V δ 1+, и определение влияния на количество клеток V δ 1+ в популяции. Влияние на количество клеток можно определить/измерить в течение определенного периода времени. Следует понимать, что эффект можно измерить по сравнению с эффектом на количество клеток, наблюдаемым, когда указанное антитело не применяется к популяции клеток в течение того же периода времени. В дополнительном аспекте данного изобретения предлагается способ выбора, характеристики или сравнения антител, или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, путем применения указанных антител к клеточной популяции, содержащей клетки V δ 1+, с последующим измерением количества указанных клеток с течением времени.

Лекарственные средства, которые регулируют пролиферативную способность и количество клеток V δ 1+.

Идеальное терапевтическое антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, которое связывается с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, может быть антителом, способным усиливать пролиферацию клеток V δ 1+ *in vivo*. Такие антитела затем можно использовать в качестве лекарственных средств, предназначенных для специфического увеличения числа клеток V δ 1+ у субъекта или пациента.

Например.

Онкологическое заболевание.

Относительное увеличение количества клеток V δ 1+ было зарегистрировано как положительный прогностический индикатор, связанный с улучшенными исходами для многих видов онкологических заболеваний (например, см. Gentles et al (2015) *Nature Immunology* 21: 938-945; Wu et al. (2019) *Sci. Trans. Med.* 11(513): eaax9364; Catellani et al. (2007) *Blood* 109(5): 2078-2085). В одном варианте реализации в настоящем документе представлено лекарственное средство, способное увеличивать относительное или абсолютное количество клеток V δ 1+ *in situ* у больного онкологическим заболеванием.

Патогенные/паразитарные/вирусные инфекции.

Обогащение клеток V δ 1+ наблюдается во время защиты хозяина от многочисленных приобретенных патогенных/паразитарных/вирусных инфекций. Для недавнего общего обзора см. Zhao et al. (2018) *Immunol. Res.* 2018:5081634. Кроме того, повышенное количество V δ 1+ также считается защитным от множества вирусных инфекций ДНК и РНК. Например, повышенное количество также считается защитным при ЦМВ-инфекциях, связанных с аллогенными трансплантатами (см. Van Dorp et al. (2011) *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 17(2): S217). Кроме того, количество клеток V δ + увеличивается у пациентов с коронавирусной инфекцией (Rossia et al. (2006) *J. Infect. Dis.* 193(9): 1244-1249).

В другом варианте реализации в настоящем документе предлагается лекарственное средство, способное увеличивать относительное или абсолютное количество клеток V δ 1+ у субъекта или пациента, являющегося носителем патогенной инфекции.

Трансплантация стволовых клеток.

Повышенное количество клеток V δ 1+ также было связано с меньшим количеством рецидивов заболевания, меньшим количеством вирусных инфекций, более высокой общей выживаемостью и безрецидивной выживаемостью и благоприятными клиническими исходами в целом во время трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (например, см. Aruda et al. (2019) *Blood* 3(21): 3436-3448 и см. Godder et al. (2007) *Bone Marrow Transplantation* 39: 751-757). Следовательно, другой вариант реализации, представленный в настоящем документе, представляет собой лекарственное средство, способное увеличивать относительное или абсолютное количество клеток V δ 1+ у субъекта как часть схемы лечения, поддерживающей трансплантацию стволовых клеток.

Следовательно, крайне желательно лекарственное средство, способное предпочтительно или специфически увеличивать количество клеток V δ 1+ *in-situ*.

Лекарственные средства, которые поддерживают, индуцируют или увеличивают секрецию цитокинов V δ 1+ клетками

Цитокины - это большая группа белков, пептидов или гликопротеинов, которые секретируются определенными клетками иммунной системы. Это категория сигнальных молекул, которые опосредуют и регулируют иммунитет, воспаление и кроветворение. Ряд цитокинов участвует в улучшении признаков и симптомов заболевания посредством прямой или косвенной модуляции опухоли и клеточного микроокружения, аутоиммунной ткани и связанной с ней микросреды или инфицированной вирусом ткани или клеточной среды. Примеры провоспалительных цитокинов включают фактор некроза опухоли-альфа (TNF α) и интерферон-гамма (IFN γ).

Однако многие такие цитокины проявляют неблагоприятную токсичность при системном дозировании. Например, хотя TNF α может вызывать геморрагический некроз пересаженных опухолей и, как сообщается, оказывает синергетический противоопухолевый эффект в сочетании с другими химиотерапевтическими препаратами, различные клинические испытания с системным рекомбинантным TNF α человека (rhTNF α) выявили значительные побочные эффекты, ограничивающие дозу, включая гипотензию, озноб, флебит, тромбоцитопению, лейкопению и гепатотоксичность, лихорадку, усталость, тошноту/рвоту, недомогание и слабость, головную боль, стеснение в груди, боли в пояснице, диарею и одышку.

При применении рекомбинантного IFN γ также сталкиваются с аналогичными проблемами системной токсичности. Например, в условиях онкологического заболевания IFN γ может оказывать благоприятные плеiotропные эффекты, включая активацию МНС класса I и II для стимуляции противоопухолевого иммунитета, увеличения инфильтрации Т-клеток, придания антиангиогенезного эффекта, индукции секреции хемокинов/цитокинов и прямого онкологического заболевания также наблюдаются клеточный антипролиферативный эффект, нежелательные побочные эффекты. К ним относятся лихорадка, головная боль, озноб, усталость, диарея, тошнота, рвота, анорексия, временное повышение печеночной трансаминазы и временное снижение количества гранулоцитов и лейкоцитов.

Для недавнего обзора потенциала и ограничений системных рекомбинантных TNF α и IFN γ см. Shen et al. (2018) *Cell Prolif.* 51(4): e12441.

Следовательно, существует потребность в более контролируемой *in situ*, более локализованной, более тканевой или клеточно-специфической продукции таких цитокинов.

Например, более контролируемая экспрессия или индукция провоспалительных цитокинов предлагается в качестве одного из подходов, с помощью которого "холодные" опухоли можно превратить в "горячие". Горячие опухоли также иногда называют "воспаленными Т-клетками" из-за наблюдаемого увеличения количества или плотности CD45+ Т-клеток. См. Bonaventura et al. (2019) *Front. Immunol.* 10: 168 для недавнего обзора.

По этим причинам идеальное терапевтическое антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, которое связывается с цепью V δ 1 TCR $\gamma\delta$, может быть антителом, которое может поддерживать, усиливать или индуцировать секрецию цитокинов в клетках V δ 1+ *in vivo*. Такие антитела затем можно использовать в качестве лекарственных средств, предназначенных для специфического увеличения или индукции цитокинов у субъекта или пациента, более локализованным, менее системным образом и таким, который лучше коррелирует с распределением клеток V δ 1+ у указанного субъекта или пациента.

Примечательно, что, когда описанные в данном документе антитела, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, применяются к клеткам V δ 1+, наблюдается значительно более высокий уровень секретируемых цитокинов. Более конкретно, и в качестве неограничивающего примера, наблюдается значительно более высокий уровень TNF α и IFN γ . См. пример 15.

Следовательно, в другом аспекте изобретения предлагается способ оценки антитела или его фрагмента, которое связывается с цепью V δ 1 TCR $\gamma\delta$, включающий введение антитела или его фрагмента в популяцию клеток, содержащую клетки V δ 1+, и определение количества по меньшей мере, один цитокин, продуцируемый популяцией клеток. Количество продуцируемого цитокина можно определять/измерять в течение определенного периода времени и, необязательно, сравнивать с количеством, наблюдаемым, когда указанное антитело не применяется к популяции клеток в течение того же периода времени. В одном варианте реализации наблюдаемый уровень цитокина, продуцируемого при введении антитела в популяцию клеток, составляет более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 50%, более чем около 100%, более чем около 150%, более чем около 200%, более чем около 250%, более чем около 300%, более чем около 350%, более чем около 400%, более чем около 450%, более чем около 500%, более чем около 1000% относительно уровня цитокина, продуцируемого без применения антитела. В дополнительном аспекте данного изобретения цитокин представляет собой провоспалительный цитокин. В дополнительном аспекте данного изобретения цитокин представляет собой цитокин TNF- α . В дополнительном аспекте данного изобретения это цитокин IFN- γ .

В дополнительном аспекте данного изобретения предлагается способ выбора, характеристики или сравнения антител, или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, путем применения указанных антител к клеточной популяции, содержащей клетки V δ 1+, и

затем измерения уровня хотя бы одного произведенного цитокина. В дополнительном аспекте данного изобретения измеряемый цитокин представляет собой цитокин TNF- α и/или цитокин IFN- γ .

В дополнительном аспекте данного изобретения предлагается способ оценки антитела или его фрагмента, которое связывается с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, путем применения указанного антитела или его фрагмента к клеточной популяции, содержащей клетки V δ 1+, и измерения эффекта антитела при модулировании более холодной или холодной опухоли, чтобы превратить в более горячую или горячую опухоль, путем определения количества продуцируемых провоспалительных цитокинов и/или количества или плотности CD45+ Т-клеток, присутствующих в опухоли или микроокружении опухоли.

Лекарственные средства, поддерживающие, индуцирующие или повышающие активность гранзима В клеток V δ 1+.

Гранзим В представляет собой сериновую протеазу, обычно обнаруживаемую в гранулах естественных клеток-киллеров (NK-клеток) и цитотоксических Т-клеток. Он секретируется этими клетками вместе с порообразующим белком перфорином, чтобы опосредовать апоптоз в клетках-мишенях, таких как пораженные клетки.

Когда клетки V δ 1+ инкубируются в совместных культурах с пораженными клетками-мишенями (такими как раковые клетки) в модельных системах, уровни и активность гранзима В могут быть измерены в пораженных клетках-мишенях перед лизисом. Примечательно, что, когда антитело или его фрагмент, как описано в настоящем документе, которое связывается с цепью V δ 1 TCR $\gamma\delta$, затем наносят на такие совместные культуры клеток V δ 1+ и раковых клеток в таких модельных системах, более высокие уровни и активность гранзима В затем наблюдаются в пораженных раковых клетках перед гибелью клеток (см. пример 16).

Следовательно, в другом аспекте данного изобретения предоставляется способ оценки антитела или его фрагмента, которое связывается с цепью V δ 1 TCR $\gamma\delta$, включающий введение антитела или его фрагмента в совместную культуру, содержащую клетки V δ 1+ и пораженные клетки (например, как раковые клетки) и измерения влияния на количество гранзима В, продуцируемого пораженными клетками в совместной культуре. Количество продуцируемого цитокина можно определять/измерять в течение определенного периода времени и, необязательно, сравнивать с количеством, наблюдаемым, когда указанное антитело не применяется к указанным совместным культурам в течение того же периода времени. В одном варианте реализации уровень гранзима В, измеренный при нанесении указанного антитела на указанную совместную культуру, составляет более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 40%, более чем около 50%, более чем около 70%, более чем около 80%, более чем около 90%, более чем около 100%, более чем около 200% относительно уровня гранзима В, наблюдаемого, когда указанное антитело не применяется.

В дополнительном аспекте данного изобретения предоставляется способ выбора, характеристики или сравнения антител, или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, путем применения указанных антител к совместной культуре, содержащей клетки V δ 1+ и пораженные клетки, а затем измерение количества или активности гранзима В в пораженной клетке.

Лекарственные средства, увеличивающие популяции поликлональных клеток V δ 1+.

Идеальное лекарственное средство на основе антител также может быть разработано для обеспечения того, чтобы размножающиеся клетки V δ 1+ не становились слишком клонально сфокусированными на уровне гипервариабельной последовательности CDR3. Следовательно, может быть разработано идеальное лекарственное средство на основе антител, позволяющее избежать индукции пролиферации клеток V δ 1+ путем связывания со специфическими или "частными" паратропами последовательности δ 1+ CDR3. Скорее, антитело может связываться через консервативные последовательности зародышевой линии, присутствующие на всех рецепторах V δ 1+ Т-клеток и независимо от гамма-цепи, и независимо от гамма-цепи образом, а не связываться с последовательностями, представленными только подмножеством клеток V δ 1+.

Следовательно, идеальное лекарственное средство на основе антител может стимулировать рост клеток V δ 1+ с образованием множества клеток V δ 1+, содержащих смесь последовательностей CDR3. Это, в свою очередь, приведет к увеличению *in vivo* гетерогенной поликлональной популяции клеток V δ 1+, отображающих различные последовательности CDR3 на дельта-вариабельной 1 цепях. Примечательно, что во время анализа размноженных популяций клеток V δ 1+, полученных методом добавления антитела или его фрагмента, как описано в настоящем документе, к исходной популяции иммунных клеток, содержащих клетки V δ 1+, наблюдается экстенсивная поликлональность с помощью методологий на основе РНКсек, разработанных для секвенирования гипервариабельных областей CDR3 экстрагированной РНК (см. пример 10).

Соответственно, в одном аспекте предлагается способ оценки антитела или его фрагмента, которое связывается с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, включающий введение антитела или его фрагмента в популяцию клеток, содержащую клетки V δ 1+, и определение поликлональности размноженных клеток V δ 1+. Желая

тельно, чтобы лекарственное средство на основе антител создавало расширенную поликлональную популяцию, содержащую множество последовательностей V δ 1+ CDR3. Поликлональность может быть определена с использованием способов, известных в данной области техники, таких как подходы к секвенированию нуклеиновых кислот, позволяющие анализировать гипервариабельное содержание CDR3 цепи V δ 1 в указанных клетках V δ 1+.

Лекарственные средства, увеличивающие поликлональные клетки V δ 1+ в течение продолжительных периодов времени.

Идеальное лекарственное средство на основе антител может усиливать, промотировать или стимулировать пролиферацию первичных клеток V δ 1+ без истощения таких клеток *in vivo*. Например, для сравнения, лекарственные средства к CD3, такие как ОКТ3 (например, муриномаб), хотя и способны увеличивать количество CD3-положительных Т-клеток, также могут истощать или вызывать анергию. Для оценки способности антител, как описано в данном документе, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, чтобы управлять продолжающимся клеточным делением жизнеспособных клеток V δ 1+, были предприняты более длительные исследования пролиферации. Примечательно, что эти исследования показали, что описанные в данном документе антитела, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, способны управлять клеточным делением/пролиферацией жизнеспособных и все еще функционально цитотоксических клеток V δ 1+ в течение более 40 дней (см. пример 10).

В одном варианте реализации предоставляется способ оценки антитела или его фрагмента, которое связывается с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, включающий нанесение антитела или его фрагмента на популяцию клеток и мониторинг продолжительности времени, в течение которого происходит деление клеток V δ 1+. В идеале антитело способно стимулировать деление клеток V δ 1+ в течение периода от 5 до 60 дней, например, по меньшей мере от 7 до 45 дней, от 7 до 21 дня или от 7 до 18 дней.

В дополнительном варианте реализации предлагается антитело или его фрагмент, как описано в настоящем документе, которое связывается с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR и которое при введении пациенту способно стимулировать деление клеток V δ 1+, увеличивая их количество по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 200 раз, по меньшей мере в 300 раз, по меньшей мере в 400 раз, по меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 1000 раз.

В дополнительном аспекте данного изобретения предлагается способ выбора, характеристики или сравнения антител, или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, путем применения указанных антител к клеткам V δ 1+ или смешанной популяции клеток, содержащей клетки V δ 1+ и затем измерение количества клеток V δ 1+ с течением времени.

Лекарственные средства, которые модулируют иммунные клетки, не относящиеся к V δ 1+, посредством нацеливания на иммунные клетки V δ 1+.

Антитело или его фрагмент, описанные в данном документе, также можно оценить путем измерения модуляции других иммунных клеток, опосредованной V δ 1+ клетками. Например, изменение, наблюдаемое во "фракции" Т-клеток, отличных от $\gamma\delta$, может быть измерено после применения антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, в модельной системе, содержащей смешанную популяцию иммунных клеток, такую как популяция, включающая $\alpha\beta$ -клетки ткани человека и $\gamma\delta$ Т-клетки. Кроме того, влияние на типы клеток, отличных от $\gamma\delta$, в указанных моделях можно измерить с помощью проточной цитометрии. Например, путем измерения относительного изменения количества CD8+ $\alpha\beta$ Т-клеток при добавлении антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, к смешанным культурам, содержащим $\gamma\delta$ Т-клетки и отличные от $\gamma\delta$ Т-клетки. Необязательно, наблюдаемое изменение количества или фенотипа отличной от $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции лимфоцитов CD8+ можно затем сравнить с изменением количества при применении альтернативного антитела сравнения (например, ОКТ-3) к указанной смешанной популяции.

Следовательно, в другом аспекте данного изобретения предоставляется способ оценки антитела или его фрагмента, которое связывается с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, включающий введение антитела или его фрагмента в смешанную популяцию иммунных клеток или тканей, содержащих клетки V δ 1+ и V δ 1-отрицательные иммунные клетки и измерение влияния на V δ 1-отрицательные иммунные клетки. Эффект можно определить/измерить в течение определенного периода времени и, необязательно, сравнить с эффектом, наблюдаемым в V δ 1-отрицательных клетках, когда указанное антитело не применяется в течение того же периода времени. Эффект можно измерить как изменение количества V δ 1-отрицательных иммунных клеток. Например, антитело может увеличивать количество V δ 1-отрицательных иммунных клеток более чем на 10%, более чем на около 20%, более чем на около 30%, более чем на около 40%, более чем на около 50%, более чем на около 70%, более чем на около 80%, более чем на около 90%, более чем на около 100%, более чем на около 500%, относительно уровней, наблюдаемых, когда указанное антитело не применяется.

В дополнительном аспекте данного изобретения модулированная V δ 1 -отрицательная клетка пред-

ставляет собой CD45+ клетку. В следующем аспекте данного изобретения модулированная клетка представляет собой $\alpha\beta$ T-клетку. В следующем аспекте данного изобретения модулированная $\alpha\beta^+$ клетка представляет собой лимфоцит CD8+. В дополнительном аспекте данного изобретения модулированная $\alpha\beta$ T-клетка или ее популяция демонстрируют признаки усиленного клеточного деления. В дополнительном аспекте данного изобретения предлагается способ выбора, характеристики или сравнения антител, или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, путем введения указанных антител в популяцию смешанных иммунных клеток, включающих клетки V δ 1+ и V δ 1-отрицательные иммунные клетки, а затем измерение эффекта, оказываемого на V δ 1-отрицательную клеточную популяцию клетками V δ 1+, модулированными указанными антителами или их фрагментами.

Необязательно, и во время "модуляции иммунной системы, опосредованной клетками V δ 1+", которая обеспечивается антителом или его фрагментом, как описано в данном документе, также наблюдается сопутствующее увеличение количества клеток V δ 1+. И хотя это не связано с этой теорией, возможно, что указанное увеличение числа клеток V δ 1+ может быть причиной сопутствующей экспансии одновременно присутствующих V δ 1-негативных иммунных клеток, таких как $\alpha\beta$ T-клетки. Альтернативная гипотеза может заключаться в том, что индуцированная антителами секреция цитокинов V δ 1+ T-клетками стимулирует рост V δ 1-отрицательных иммунных клеток.

В еще одном аспекте данного изобретения наблюдаемое увеличение популяции лимфоцитов $\alpha\beta^+$ CD8+ сравнивают с антителом сравнения, таким как антитело ОКТ3 или альтернативное антитело к V δ 1. В дополнительном аспекте данного изобретения предлагается способ выбора, характеристики или сравнения антител, или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, путем применения указанных антител к популяции смешанных иммунных клеток, содержащих V δ 1+ T-клеток и $\alpha\beta$ T-клеток, а затем измерения количества лимфоцитов CD8+ $\alpha\beta^+$ T-клеток с течением времени.

Лекарственные средства, которые модулируют лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL).

Антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе, также можно оценить путем измерения эффекта, оказываемого на популяции, инфильтрирующие опухоль (TIL), в модельных системах. Неожиданно (см. Пример 18) во время таких оценок антитела, как описано в данном документе, измеримо модулировали популяции TIL в опухолях человека. Например, изменение количества или фенотипа TIL-популяции $\gamma\delta^+$ лимфоцитов или TIL-популяции не- $\gamma\delta$ лимфоцитов измеряется после нанесения антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, на опухоль человека, такую как почечно-клеточная карцинома человека. Необязательно, наблюдаемое изменение количества или фенотипа либо TIL-популяции $\gamma\delta^+$ лимфоцитов, либо TIL-популяции не- $\gamma\delta$ лимфоцитов можно затем сравнить с изменением, наблюдаемым при применении альтернативного антитела сравнения (например, ОКТ-3) к указанной модельной системе.

Следовательно, в другом аспекте данного изобретения предоставляется способ оценки антитела или его фрагмента, которое связывается с цепью V δ 1 TCR $\gamma\delta$, включающий введение антитела или его фрагмента в TIL, расположенные в опухоли человека или происходящие из нее, и определение влияния на количество TIL. Эффект можно определить/измерить в течение определенного периода времени и, необязательно, сравнить с числом TIL, наблюдаемым, когда указанное антитело не применяется в течение того же периода времени. Эффект может заключаться в увеличении количества TIL. Например, антитело может увеличивать количество TIL более чем на около 10%, более чем на около 20%, более чем на около 30%, более чем на около 40%, более чем на около 50%, более чем на около 70%, более чем на около 80%, более чем на около 90%, более чем на около 100% относительно количества TIL, наблюдаемых, когда указанное антитело не применяется. В дополнительном аспекте, TIL, в которых наблюдается количество, представляют собой TIL-клетки $\gamma\delta^+$ лимфоцитов и/или TIL-клетки не- $\gamma\delta$ лимфоцитов.

В дополнительном аспекте данного изобретения предлагается способ выбора, характеристики или сравнения антител, или их фрагментов, как описано в настоящем документе, которые связываются с цепью V δ 1 антител клеток $\gamma\delta$ TCR, путем применения указанных антител к TIL или TIL, расположенным в или полученным из опухоли человека, а затем измерение изменения количества TIL или TIL-клеток за период времени.

Лекарственные средства, которые модулируют цитотоксичность V δ 1+ человека.

Антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, также можно оценить путем измерения придаваемого эффекта на опосредованную V δ 1+ клеточную цитотоксичность. Неожиданно, во время таких оценок антител, как описано в данном документе (например, см. Пример 19), наблюдали ощутимое усиление опосредованной V δ 1+ клеточной цитотоксичности. Например, уменьшение количества раковых клеток или увеличение количества уничтоженных раковых клеток наблюдается после нанесения антитела или его фрагмента на модельную систему, содержащую смешанную культуру, содержащую клетки V δ 1+ и указанные раковые клетки. Необязательно, уменьшение количества раковых клеток или увеличение количества уничтоженных раковых клеток затем можно сравнить с результатом, когда к ука-

занным модельным системам применяют альтернативное антитело сравнения (например, ОКТ-3).

Следовательно, в другом аспекте данного изобретения предоставляется способ оценки антитела или его фрагмента, которое связывается с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, включающий нанесение антитела или его фрагмента на смешанную популяцию клеток, включающую клетки V δ 1+ и раковые клетки и измерение цитотоксичности клеток V δ 1+ по отношению к раковым клеткам. Цитотоксичность можно измерить по увеличению количества мертвых раковых клеток за период времени, необязательно по сравнению с количеством мертвых раковых клеток, наблюдаемых, когда указанное антитело не применяется к смешанной популяции клеток в течение того же периода времени. Например, наблюдаемое увеличение количества мертвых клеток при применении указанного антитела может составлять более чем на около 10%, более чем на около 20%, более чем на около 30%, более чем на около 40%, более чем на около 50%, более чем на около 70%, более чем на около 80%, более чем на около 90%, более чем на около 100%, более чем на около 200%, более чем на около 500% относительно количества мертвых клеток, наблюдаемых, когда указанное антитело не применяется.

В дополнительном аспекте данного изобретения предлагается способ выбора, характеристики или сравнения антител, или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с цепью V δ 1 клеток $\gamma\delta$ TCR, путем добавления указанных антител к указанной популяции смешанных иммунных клеток, содержащих клетки V δ 1+ человека и раковые клетки, а затем измеряют увеличение количества мертвых раковых клеток с течением времени.

Лекарственные средства, которые модулируют соотношение клеток-мишеней и эффекторных клеток V δ 1+ (отношения Т:Е).

Антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, также можно оценить путем измерения того, как указанные антитела усиливают V δ 1+ -опосредованную цитотоксичность раковых клеток, путем определения соотношения целевой клетки к эффекторным клеткам, при котором 50% клеток-мишеней (EC50) погибают в модельной системе чтобы оценить указанные антитела как потенциальные лекарственные средства. Например, смешанные культуры, содержащие раковые клетки-мишени с эффекторными клетками V δ 1+ человека. Неожиданно оказалось, что во время таких оценок (например, см. Пример 19) описанные в данном документе антитела благоприятно изменяют соотношение EC50 Т:Е в модельных системах. Такие модификации можно измерить как количество клеток V δ 1+, необходимое для наблюдения 50%-ного уничтожения раковых клеток в течение установленного времени. Об этом также можно сообщить как об изменении, кратном улучшении или как процентном повышении цитотоксичности по отношению к указанным раковым клеткам. Необязательно, соотношение Т:Е, придаваемое антителами по данному изобретению, затем можно сравнить с отношениями Т:Е, когда к указанным модельным системам применяют альтернативное антитело сравнения (например, ОКТ-3).

Следовательно, в другом аспекте данного изобретения предлагается способ оценки антитела или его фрагмента, которое связывается с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, включающий применение антитела или его фрагмента к смешанной популяции клеток, включающей клетки V δ 1+ человека и раковые клетки, и измерение количества клеток V δ 1+, необходимого для уничтожения 50% раковых клеток. Это может быть измерено относительно количества клеток V δ 1+, необходимого для уничтожения 50% раковых клеток без применения указанного антитела, необязательно в течение того же периода времени. Например, уменьшение количества клеток V δ 1+, необходимого для уничтожения 50% раковых клеток при применении указанного антитела, может быть более чем на около 10%, более чем на около 20%, более чем на около 30%, более чем на около 40%, более чем на около 50%, более чем на около 70%, более чем на около 80%, более чем на около 90%, более чем на около 100%, более чем на около 200%, более чем на около 500%, относительно количества требуемых клеток V δ 1+ для уничтожения 50% раковых клеток, когда указанное антитело не применяется.

В дополнительном аспекте данного изобретения предлагается способ выбора, характеристики или сравнения антител, или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с цепью V δ 1, путем добавления указанных антител к указанной популяции клеток, включающей клетки V δ 1+ плюс раковые клетки, и затем измерения количество клеток V δ 1+, необходимого для уничтожения 50% раковых клеток.

Лекарственные средства, которые усиливают цитотоксичность EC50 клеток V δ 1+.

Альтернативный способ измерения наблюдаемой повышенной цитотоксичности человеческих клеток V δ 1+ или их популяции состоит в том, чтобы измерить количество клеток, необходимых для уничтожения 50% раковых клеток в течение заданного периода времени в состоянии А (например, начальный контроль), и сравнении этого к количеству клеток, необходимому для уничтожения 50% раковых клеток в течение установленного периода времени в условиях В (например, при применении антитела по изобретению, как описано в настоящем документе).

Хотя признается, что существует множество способов измерения таких параметров, чтобы помочь в понимании, будет приведен следующий неограничивающий гипотетический пример.

Гипотетически усиление цитотоксичности эффекторных клеток можно измерить следующим образом:

- в состоянии А (контрольное лечение) наблюдается, что требуется 1000 клеток Vδ1+ для уничтожения 50% раковых клеток в течение установленного периода времени (например, 5 ч). В состоянии В (например, применение антитела по данному изобретению, описанного в данном документе) наблюдали, что 500 клеток Vδ1+ требовалось для уничтожения 50% раковых клеток за тот же период времени. Следовательно, в этом примере применение антитела увеличило цитотоксичность популяции клеток Vδ1+ на 200%:

$$(1000/500) \times 100 = 200\%$$

Например, (см. Пример 19), неожиданно такое процентное увеличение наблюдалось для антител по данному изобретению, как описано в данном документе.

В дополнительном аспекте изобретения предлагается способ выбора, характеристики или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с цепью Vδ1 γδ TCR, путем добавления указанных антител к указанной популяции смешанных иммунных клеток, включающих клетки Vδ1+ и раковые клетки, и определение относительного или процентного изменения цитотоксичности по сравнению с эквивалентным или контрольным экспериментом, в котором указанное антитело не применяется к указанной смеси клеток.

Лекарственные средства, которые повышают специфичность клеток Vδ1+ к пораженным клеткам, сохраняя при этом здоровые клетки.

Другой подход к оценке антител или их фрагментов, как описано в данном документе, заключается в измерении того, как указанные антитела модулируют специфическую цитотоксичность пораженных клеток. Неожиданно в ходе таких исследований было обнаружено, что такие антитела могут специфически усиливать специфическое для Vδ1+ уничтожение пораженных клеток, таких как раковые клетки (например, см. Пример 19), при сохранении здоровых или непораженных клеток. Идеальные лекарственные средства на основе антител, вводимые пациенту для облегчения симптома онкологического заболевания, будут придавать повышенную цитотоксичность конкретно по отношению к пораженным клеткам, сохраняя при этом здоровые клетки. И можно сказать, что лекарственные средства, которые увеличивают цитотоксичность эффекторных клеток, в частности, по отношению к пораженным клеткам, таким как раковые клетки, демонстрируют повышенный терапевтический индекс (ТИ) по сравнению с лекарственными средствами, которые избирательно не усиливают цитотоксичность эффекторных клеток, конкретно по отношению к указанным пораженным клеткам. Терапевтический индекс также называется терапевтическим соотношением и является количественным показателем относительной безопасности лекарственного средства. Это сравнение количества терапевтического агента, вызывающего терапевтический эффект, с количеством, вызывающим токсичность, например, вызывая нежелательную гибель родственных или значимых популяций здоровых клеток. Антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, можно оценить путем измерения его способности изменять, увеличивать или кратно улучшать способность клеток Vδ1+ избирательно убивать пораженные клетки по сравнению со здоровыми клетками в модельных системах. Например, указанные модельные системы могут включать эффекторные клетки Vδ1+, раковые клетки и контрольные клетки (такие как здоровые клетки). Необязательно, кратное улучшение селективного уничтожения пораженных клеток, обеспечиваемое антителами по данному изобретению, затем можно сравнить с кратным улучшением, наблюдаемым при применении альтернативного антитела сравнения (например, ОКТ-3) к указанным модельным системам.

Специфичность к пораженным клеткам и усиление специфичности к пораженным клеткам клеток Vδ1+ можно измерить в культурах, содержащих клетки Vδ1+, пораженные клетки и здоровые клетки. Например, специфичность Vδ1+ по отношению к пораженным клеткам можно измерить, наблюдая за количеством раковых клеток, уничтоженных клетками Vδ1+, и затем сравнивая количество здоровых клеток, уничтоженных клетками Vδ1+. Такие сравнения можно контролировать, включая эквивалентные количества пораженных клеток и здоровых клеток в модельную систему, также содержащую клетки Vδ1+, например, "трикультуры". Также можно рассмотреть альтернативную методологию сравнения, например, когда аналитические или аппаратные ограничения снижают способность различать и отслеживать все три или более типов клеток параллельно в одном анализе (включая клетки Vδ1+, пораженные клетки и нездоровые клетки). В указанных случаях сравнение цитотоксичности клеток Vδ1+ по отношению к пораженным клеткам в одном эксперименте и затем сравнение цитотоксичности клеток Vδ1+ по отношению к здоровым клеткам в отдельном эквивалентном эксперименте предлагает альтернативный подход к таким исследованиям.

В другом аспекте данного изобретения предложен способ оценки антитела или его фрагмента, которое связывается с цепью Vδ1 γδ TCR, включающий введение антитела или его фрагмента в популяцию клеток, содержащую клетки Vδ1+ и клетки-мишени, и измерение клеточной цитотоксической специфичности по отношению к клеткам-мишеням. В одном варианте реализации специфичность клеточной цитотоксичности по отношению к первому типу клеток-мишеней можно сравнить с цитотоксичностью, наблюдаемой по отношению ко второму типу клеток-мишеней, поэтому способ можно повторить с использованием различных типов клеток-мишеней. В дополнительном аспекте данного изобретения первый тип

клетки-мишени представляет собой пораженную клетку, а второй тип клетки-мишени представляет собой контрольную клетку, такую как здоровая клетка или клетка с заболеванием, отличным от первого типа клеток-мишеней.

В дополнительном аспекте данного изобретения предлагается способ выбора, характеристики или сравнения антител, или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, при этом эффект, оказываемый указанным антителом на цитотоксичность клеток V δ 1+ по отношению к (i) клеткам первого типа и (ii) клеткам второго типа измеряются и сравниваются. В следующем аспекте данного изобретения таким образом выбирают антитело, которое усиливает специфическую цитотоксичность по отношению к первому типу клеток в большей степени, чем по отношению ко второму типу клеток. В дополнительном аспекте изобретения первый тип клеток представляет собой пораженную клетку, а второй тип клеток представляет собой здоровую клетку.

Как описано в данном документе, антитела или их фрагменты, используемые в анализах, могут быть представлены на поверхности, например, поверхности клетки, такой как клетка, содержащая рецептор Fc. Например, антитела или их фрагменты могут быть представлены на поверхности клеток ТНР-1, таких как клетки Т1В-202TM (доступные из Американской коллекции типовых культур (АТСС)). Альтернативно, антитела или их фрагменты можно использовать непосредственно в анализах.

В таких функциональных анализах выход может быть измерен путем вычисления половины максимальной концентрации, также называемой "EC50" или "эффективной концентрацией при 50 процентах". Термин "IC50" относится к ингибирующей концентрации. И EC50, и IC50 можно измерить с использованием методов, известных в данной области техники, таких как методы проточной цитометрии. В некоторых случаях EC50 и IC50 имеют одинаковое значение или могут считаться эквивалентными. Например, эффективная концентрация (EC) эффекторных клеток, необходимая для ингибирования (например, уничтожения) 50% клеток определенного типа, также может считаться 50% ингибирующей концентрацией (IC). Во избежание сомнений, значения EC50 в настоящей заявке предоставлены с использованием антитела в формате IgG1, когда речь идет об антителе. Такие значения могут быть легко преобразованы на основе молекулярной массы формата антитела в эквивалентные значения следующим образом:

$$(\text{мкг/мл}) / (\text{ММ в кДа}) = \text{мкМ}$$

EC50 для подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании антитела (или фрагмента) может быть менее чем 0,50 мкг/мл, например, менее чем 0,40 мкг/мл, 0,30 мкг/мл, 0,20 мкг/мл, 0,15 мкг/мл, 0,10 мкг/мл, 0,06 мкг/мл или 0,05 мкг/мл. В предпочтительном варианте реализации EC50 для подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании антитела (или фрагмента) составляет менее чем 0,10 мкг/мл. В частности, EC50 для подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании антитела (или фрагмента) может составлять менее чем 0,06 мкг/мл, например, менее чем 0,05 мкг/мл, 0,04 мкг/мл или 0,03 мкг/мл. В частности, указанные значения EC50 соответствуют измерению антитела в формате IgG1. Например, значение подавления TCR EC50 $\gamma\delta$ можно измерить с помощью проточной цитометрии (например, как описано в анализе примера 6).

EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании антитела (или фрагмента) может быть менее чем 0,050 мкг/мл, например, менее чем 0,040 мкг/мл, 0,030 мкг/мл, 0,020 мкг/мл, 0,015 мкг/мл, 0,010 мкг/мл или 0,008 мкг/мл. В частности, EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании антитела (или фрагмента) может быть менее чем 0,005 мкг/мл, например, менее чем 0,002 мкг/мл. В предпочтительном варианте реализации EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании антитела (или фрагмента) составляет менее чем 0,007 мкг/мл. В частности, указанные значения EC50 соответствуют измерению антитела в формате IgG1. Например, значение EC50 дегрануляции Т-лимфоцитов можно измерить путем определения экспрессии CD107a (т.е. маркера дегрануляции клеток) с использованием проточной цитометрии (например, как описано в анализе примера 7). В одном варианте реализации, экспрессию CD107a измеряют с использованием антитела к CD107a, такого как BV421 к CD107a человека (клон H4A3) (BD Biosciences).

EC50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании антитела (или фрагмента) может быть менее чем 0,50 мкг/мл, например, менее чем 0,40 мкг/мл, 0,30 мкг/мл, 0,20 мкг/мл, 0,15 мкг/мл, 0,10 мкг/мл или 0,07 мкг/мл. В предпочтительном варианте реализации EC50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании антитела (или фрагмента) составляет менее чем 0,10 мкг/мл. В частности, EC50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании антитела (или фрагмента) может быть менее чем 0,060 мкг/мл, например, менее чем 0,055 мкг/мл, в частности менее чем 0,020 мкг/мл. В частности, указанные значения EC50 соответствуют измерению антитела в формате IgG1. Например, значение уничтожения Т-лимфоцитов EC50 $\gamma\delta$ может быть измерено путем определения доли мертвых клеток (т.е. с использованием красителя для определения жизнеспособности клеток) с использованием проточной цитометрии после инкубации антитела, $\gamma\delta$ Т-клеток и клеток-мишеней (например, как описано в анализе Примера 8). В одном варианте реализации гибель клетки-мишени измеряют с использованием красителя для определения жизнеспособности клеток, представляющего собой краситель Viability Dye eFluorTM 520 (ThermoFisher).

В анализах, описанных в этих аспектах, антитело или его фрагмент могут быть представлены на поверхности клетки, такой как клетка ТНР-1, например, Т1В-202TM (АТСС). Клетки ТНР-1 необязательно метят красителем, таким как CellTrackerTM Orange CMTMR (ThermoFisher).

Иммуноконъюгаты

Антитела или их фрагменты по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическим компонентом, таким как цитотоксин или химиотерапевтический агент. Такие конъюгаты могут называться иммуноконъюгатами. В контексте настоящего описания термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое химически или биологически связано с другим фрагментом, таким как цитотоксин, радиоактивный агент, цитокин, интерферон, целевой или репортерный фрагмент, фермент, токсин, пептид или белок, или терапевтическое средство. Антитело может быть связано с цитотоксином, радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, токсином, пептидом или терапевтическим агентом в любом месте молекулы, если оно способно связывать свою мишень. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитело-лекарственное средство и слитые белки антитело-токсин. В одном варианте реализации агент может представлять собой второе антитело, отличное от V δ 1. В некоторых вариантах реализации антитело может быть конъюгировано с агентом, специфичным для опухолевой клетки или инфицированной вирусом клетки. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом к V δ 1, будет учитывать состояние, которое необходимо лечить, и желаемый терапевтический эффект, который должен быть достигнут. В одном варианте реализации агент может представлять собой второе антитело или его фрагмент, которое связывается с молекулой, отличной от V δ 1.

Мультиспецифические антитела

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифичными или могут связывать дополнительные мишени и, следовательно, быть биспецифичными или мультиспецифичными. Мультиспецифические антитела могут быть специфичными для разных эпитопов одного полипептида-мишени или могут быть специфичными для более чем одного полипептида-мишени. Следовательно, в одном варианте реализации антитело или его фрагмент имеют первую специфичность связывания с V δ 1 и вторую специфичность связывания для второго целевого эпитопа.

В различных вариантах реализации второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп ракового антигена или ассоциированного с раком антигена. В различных вариантах реализации раковый антиген или связанный с раком антиген представляет собой антиген, выбранный из AFP, АКАР-4, ALK, альфафетопротеина, рецептора андрогенов, V7H3, BAGE, BCA225, BCAA, Vcr-ab1, бета-катенина, бета-ХГЧ, бета-хорионического гонадотропина человека, BORIS, ВТАА, CA 125, CA 15-3, CA 195, CA 19-9, CA 242, CA 27.29, CA 72-4, CA-50, CAM 17.1, CAM43, карбоангидразы IX, карциноэмбрионального антигена, CD22, CD33/IL3Ra, CD68/P1, CDK4, CEA, хондроитинсульфат протеогликана 4 (CSPG4), с-Met, CO-029, CSPG4, циклина B1, белка, связанного с циклофилином C, CYP1B1, E2A-PRL, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, эфрина B2, антигенов вируса Эпштейна-Барра EBVA, ERG (ген слияния TMPRSS2ETS), ETV6-AML, FAP, FGF-5, Fos-родственного антигена 1, фукозил GM1, G250, Ga733/EpCAM, GAGE-1, GAGE-2, GD2, GD3, ассоциированный с глиомой антигена, GloboH, гликолипида F77, GM3, GP 100, GP 100 (Pmel 17), H4-RET, HER-2/neu, HER-2/Neu/ErbB-2, высокомолекулярного антигена, связанного с меланомой (HMW-MAA), HPV E6, HPV E7, hTERT, HTgp-175, обратной транскриптазы теломеразы человека, идиотипа, рецептора IGF-I, IGF-II, IGH-IGK, инсулинового фактора роста (IGF)-I, карбоксиластеразы кишечника, K-ras, LAGE-1a, LCK, лектин-реактивного AFP, легумаина, LMP2, M344, MA-50, связывающего Мас-2 белка, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, MART-1, MART-1/MelanA, M-CSF, связанного с меланомой хондроитинсульфат протеогликана (MCSP), мезотелин, MG7-Ag, ML-IAP, MN-CA IX, MOV18, MUC1, Mum-1, hsp70-2, MYCN, MYL-RAR, NA17, NB/70K, нейрон-глиального антигена 2 (NG2), эластазы нейтрофилов, nm-23H1, NuMa, NY-BR-1, NY-CO-1, NY-ESO, NY-ESO-1, NY-ESO-1, OY-TESE1, p15, p16, p180erbB3, p185erbB2, p53, мутанта p53, Page4, PAX3, PAX5, PDGFR-бета, PLAC1, полисиаловой кислоты, опухолевого антигена-1 карциномы простаты (PCTA-1), простатоспецифического антигена, кислой фосфатазы простаты (PAP), протеиназы 3 (PR1), PSA, PSCA, PSMA, RAGE-1, Ras, Ras-мутант, R CAS1, RGS5, RhoC, ROR1, RU1, RU2 (AS), SART3, SDCCAG16, sLe(a), белка спермы 17, SSX2, STn, сурвивина, TA-90, TAAL6, TAG-72, теломеразы, тиреоглобулина, Tie 2, TIGIT, TLP, Tn, TPS, TRP-1, TRP-2, TRP-2, TSP-180, тирозиназы, VEGFR2, VISTA, WT1, XAGE 1, 43-9F, 5T4 и 791Tgp72.

В различных вариантах реализации второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп кластера дифференцировочного антигена CD. В различных вариантах реализации антиген CD представляет собой антиген, выбранный из CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32A, CD32B, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79A, CD79B, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85B, CD85C, CD85D, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD85M,

CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140A, CD140B, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158, CD158A, CD158B1, CD158B2, CD158C, CD158D, CD158E1, CD158E2, CD158F1, CD158F2, CD158G, CD158H, CD158I, CD158J, CD158K, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD167b, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD187, CD188, CD189, CD190, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210a, CDw210b, CD211, CD212, CD212, CD213a1, CD213a2, CD214, CD215, CD216, CD217, CD218a, CD218b, CD219, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD237, CD238, CD239, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245[17], CD246, CD247, CD248, CD249, CD250, CD251, CD252, CD253, CD254, CD255, CD256, CD257, CD258, CD259, CD260, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD285, CD286, CD287, CD288, CD289, CD290, CD291, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300A, CD300C, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD308, CD309, CD310, CD311, CD312, CD313, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD323, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD330, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370 и CD371.

Хотя механизмы, с помощью которых Т-клетки $\gamma\delta$ распознают антигены и различают здоровые и пораженные клетки, полностью не изучены (Ming Heng and Madalene Heng, Antigen Recognition by $\gamma\delta$ T-Cells. Madame Curie Bioscience Database [Internet], Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013), тот факт, что $\gamma\delta$ Т-клетки способны различать здоровые клетки и пораженные клетки и проявлять значительную полицитотоксичность пораженных клеток (см. неограничивающие примеры типов клеток в табл. 1), это означает, что их можно использовать для улучшения лекарственных средств с улучшенными терапевтическими диапазонами. Кроме того, используя такие возможности $\gamma\delta$ Т-клеток, предоставляется возможность лечить заболевание, сохраняя при этом здоровые клетки, путем совместной локализации $\gamma\delta$ Т-клеток с пораженными клетками, даже если конкретный раковый антиген, воспалительный антиген или антиген патогена либо неизвестен, или также присутствует на здоровых клетках у конкретного пациента.

Пример раковых клеток, уничтоженных полицитотоксическими клетками V δ 1+ человека

Онкологическое заболевание молочной железы	
M-CSF7, T47D, MDA-MB-231	Mahvi et al (1993) Cancer Imm. Immunother. (1993) 37:181 – 186 Dutta I et al (2017). Front. Immunol. 8:776
Онкологическое заболевание легких	
GLC1, N592	Ferrarini et al (1996) Jn of Nat. Cancer Inst., Volume 88 (7) pp 436–441
Онкологическое заболевание поджелудочной железы	
panc89, QGP-1, PANC-1	Maeurer et al (1996) JEM 183 (4) 1681-1696 Kitayama 1993 Clin Exp Imm 93 (3) 442-7
Онкологическое заболевание желудочно-кишечного тракта	
HT29, HCT116, Y, SKCO1, Caco2, HCT116, Lovo, DLD-1, SW480	Wu, et al. (2015), OncoImmunology, 4:3, e992749 Mikulak, et al (2019) JCI Insight. 4(24):e125884 Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Нейробластома	
LAN1, KELLY	Fisher et al (2014) Clin Cancer Res; 20(22); 5720–32
Меланома	
A375	Cordova (2012) Plos ONE 7 (11) e49878
Онкологическое заболевание яичников	
OV-1063, SW626	Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Онкологическое заболевание печени	
HepG2	Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Онкологическое заболевание шейки матки	
HeLa	Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Онкологическое заболевание простаты	
DV145, PC-3	Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Множественная миелома	
ARH77, U266	Knight et al (2012) Cytotherapy, 14:9, 1110-1118,
ОМЛ	
KG-1, KASUMI-1, OCI-AML3, U937, HL60, MV4 11, AML193, HEL, THP-1	Lorenzo et al (2019) Canc Imm Res 7 (4)
ХЛЛ	
MEC-1	Almeida et al (2016) Clin Can Res 22 (23)

В качестве одного неограничивающего примера недавние исследования мультиспецифичности CD3xHER2 подчеркивают проблемы существующих или традиционных подходов. В частности, использование таких традиционных подходов может привести к менее благоприятным профилям токсичности. Это связано с тем, что, как и многие другие антигены, ассоциированные с опухолью (ТАА), антиген HER2 не только экспрессируется при онкологическом заболевании таком как онкологическое заболевание груди, но также экспрессируется в здоровых тканях, таких как клетки сердца. Следовательно, использование лекарственных средств CD3xHER2, которые взаимодействуют и локализуют все Т-клетки с HER2-положительными клетками, может привести к менее благоприятным терапевтическим диапазонам или терапевтическим индексам. Это связано с тем, что такие лекарственные средства будут воздействовать на все Т-клетки, из которых подавляющее большинство в циркуляции будет $\alpha\beta$ Т-клетками (CD4+ положительные, CD8+ положительные и т.д.). И как только $\alpha\beta$ Т-клетки локализируются вместе с HER2-положительными клетками, такие обычные $\alpha\beta$ Т-клетки демонстрируют ограниченные возможности по сохранению здоровых клеток HER2+ и ограниченные возможности уничтожить только пораженные HER2+ пораженные клетки. Следовательно, и в качестве этого примера в исследованиях на яванских макаках, в которых вводили такие биспецифические препараты CD3xHER2, в некоторых ситуациях требовалась ранняя эвтаназия (даже в день введения дозы). Кроме того, во время этого примера исследования (см. Stafflin et al. (2020) JCI Insight 5(7): e133757) был сделан вывод, что перенацеливание Т-клеток на уничтожение HER2-экспрессирующих клеток может вызывать неблагоприятные эффекты на HER2-экспрессирующие ткани. Было отмечено, что, за исключением печени, все пораженные или поврежденные ткани экспрессировали HER2.

В дополнительном неограничивающем примере вторая специфичность связывания может относиться к ассоциированному с опухолью фрагменту, также участвующему в контроле или регулировании функции иммунных клеток. Например, вторая специфичность может быть разработана для нацеливания на так называемый "ингибитор контрольной точки", такой как PD-L1 (CD274) или CD155. И снова ни PD-L1, ни CD155 не являются на 100% специфичными для заболевания. Оба белка также могут экспрессироваться на здоровых клетках. Однако мультиспецифические антитела, разработанные для специфической совместной локализации клеток V δ 1+ либо с PD-L1-положительными клетками, либо с CD155-положительными клетками, могут приводить к селективному уничтожению PD-L1 или CD155-положительных пораженных, или раковых клеток. Дальнейшее нацеливание на ингибиторы связанных с заболеванием контрольных точек, присутствующих на пораженных клетках, таких как раковые клетки, не только будет совместно локализовать клетки V δ 1+ в таких опухолях, но также может дать дополнительные благоприятные эффекты, например, путем модуляции или подавления передачи сигнала PD-1/PD-L1 или TIGIT/CD155, который в противном случае может негативно регулировать опосредованный T-клетками иммунный ответ на заболевание.

Следовательно, вместо использования таких традиционных подходов в настоящем документе представлены мультиспецифические антитела, в которых по меньшей мере одна первая специфичность связывания способна связывать клетки V δ 1+, а по меньшей мере одна вторая специфичность связывания способна связывать мишени, присутствующие на пораженных тканях и клетках. Таким образом, применение таких мультиспецифических антител может привести к совместной локализации клеток V δ 1+ с пораженными клетками, экспрессирующими вторую мишень. Кроме того, учитывая, что такие ассоциированные с заболеванием мишени не всегда на 100% специфичны для заболевания, этот подход, в частности, нацеливание и совместная локализация эффекторных клеток V δ 1+, может быть более предпочтительным по сравнению с традиционными подходами. Это связано с тем, что эффекторные клетки V δ 1+ могут быть способны распознавать паттерны стресса в пораженных или инфицированных клетках и, таким образом, способны избирательно убивать пораженные клетки, сохраняя при этом здоровые клетки, также экспрессирующие ту же мишень.

В дополнительном неограничивающем примере у пациента может быть онкологическое заболевание печени, при котором у пациента не известен специфический антиген онкологического заболевания печени. В этом случае вторая специфичность мультиспецифического антитела может относиться к эпитопу, присутствующему на многих или всех клетках печени, таком как, например, рецептор асиалогликопротеина 1. Затем это приведет к совместной локализации $\gamma\delta$ T-клеток в печени, где $\gamma\delta$ T-клетки могут убивать раковые клетки печени, сохраняя при этом здоровые клетки печени. В качестве третьего неограничивающего примера у пациента с онкологическим заболеванием легкого, у которого не известен антиген онкологического заболевания легкого, вторая специфичность мультиспецифического антитела может относиться к эпитопу на нормальной клетке легкого, такой как, например, SP-1. Это приведет к совместной локализации $\gamma\delta$ T-клеток в легком, где $\gamma\delta$ T-клетки могут убивать раковые клетки легких, сохраняя при этом здоровые клетки легких. В качестве четвертого неограничивающего примера у пациента с В-клеточной лимфомой, у которого не известен антиген В-клеточной лимфомы, вторая специфичность мультиспецифического антитела может относиться к эпитопу на нормальных В-клетках, такой как, например, CD19. Это приведет к совместной локализации $\gamma\delta$ T-клеток с В-клетками, где $\gamma\delta$ T-клетки могут убивать клетки лимфомы, сохраняя при этом здоровые В-клетки. Клеточно-специфические антигены, ассоциированные с клетками антигены, тканеспецифические антигены и ассоциированные с тканями антигены хорошо известны в данной области техники, и любой такой антиген может быть мишенью второй специфичности мультиспецифических антител по данному изобретению.

Вторая специфичность связывания может нацеливать антиген на ту же клетку, что и V δ 1, или на другую клетку того же типа ткани или другого типа ткани. В некоторых вариантах реализации целевой эпитоп может находиться на другой клетке, включая другую T-клетку, В-клетку, опухолевую клетку, клетку аутоиммунной ткани или инфицированную вирусом клетку. Альтернативно целевой эпитоп может находиться в одной и той же клетке.

Мультиспецифические антитела или их фрагменты могут быть изготовлены в любом формате при условии, что антитело или его фрагмент обладает множественной специфичностью. Примеры форматов мультиспецифических антител включают, но не ограничиваются ими, CrossMab, DAF (два-в-одном), DAF (четыре-в-одном), DutaMab, DT-IgG, ручки в отверстиях (КИШ), ручки в отверстиях (общая легкая цепь), зарядная пара, замена Fab-области, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y, Fcab, κ Л-тело, ортогонального Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zyboby, DVI-IgG (четыре-в-одном), нанотело, нанотело-HAS, BiTE, диатело, DART, TandAb, sc-Диатело, sc-Диатело-CH3, Диатело-CH3, тройное тело, форматы Моррисона, миниантитело, минитело, TriBi минитело, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')₂, F(ab)₂-scFv₂, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, четырехвалентное HCAb, sc-Диатело-Fc, Диатело-Fc, тандемный scFv-Fc, интратела, Dock and Lock, ImmTAC, HSA-тела, sc-Диатело-HAS, тандемный scFv-токсин, IgG-IgG, ov-X-тело, диатело, mab2 и scFv1-PEG-scFv₂ (см. Spiess et al. (2015) Мо-

lecular Immunology 67:95-106).

Антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, также можно оценить путем измерения его способности к расширенной функциональности в мультиспецифическом формате, таком как биспецифический или триспецифический формат. Неожиданно с помощью таких исследований можно идентифицировать еще одно функциональное улучшение характеристик антител или их фрагментов, как описано в данном документе (см. примеры 20 и 21).

Различные мультиспецифические форматы, полученные на основе антител, были описаны ранее и обычно создаются эмпирически из частей, связывающих компоненты. Как правило, однажды сконструированные характеристики таких мультиспецифических или мультицелевых форматов связывания, как описано в данном документе, могут быть измерены в одной или более из вышеупомянутых модельных систем (убийство клеток, пролиферация клеток, модели сохранения здоровых клеток/специфических для пораженных клеток и т.д.). Необязательно их также сравнивают с указанными составными частями и другими молекулами сравнения.

Не ограничиваясь этим подходом, в целом при конструировании антител в качестве полиспецифических антител модули связывающего домена для каждой мишени (первой, второй, третьей и т.д.) необязательно строятся из scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, вариабельный домен (например, VH или VL), диатело, минитело или полноразмерные антитела. Например, каждый указанный связывающий домен или модуль создается в одном или более из следующих неограничивающих форматов, в которых связывающие домены, содержащие вариабельные домены, и/или полноразмерные антитела, и/или фрагменты антител, функционально связаны последовательно для образования мультиспецифических антител.

Примечательно, что мультиспецифические антитела, содержащие по меньшей мере один (первый) связывающий домен, нацеленный на цепь V δ 1 TCR $\gamma\delta$, как описано в данном документе, дополнительно усиливаются, когда указанный первый связывающий домен отформатирован в формате мультиспецифического антитела, содержащего по меньшей мере один второй связывающий домен, либо против тканевых ("твердых") и гемопоэтических ("жидких") заболеваний, либо против мишеней, связанных с типом клеток.

Мультиспецифические антитела - неограничивающие примеры

Для того, чтобы обозначить применимость подхода, была сконструирована серия неограничивающих примеров мультиспецифических антител. Эти мультиспецифические антитела содержат по меньшей мере один (первый) связывающий домен, нацеленный на цепь V δ 1 TCR $\gamma\delta$, и по меньшей мере один (второй) связывающий домен, нацеленный на мишень, связанную с заболеванием:

Первый пример; мультиспецифическое антитело к V δ 1-EGFr.

В этом примере один связывающий домен (с первой мишенью) содержал интактные фрагменты антитела, в частности, VH-CH1-CH2-CH3 и родственные партнеры VL-CL, тогда как второй связывающий домен (со второй мишенью) содержал фрагмент антитела; в частности, формат scFv. Затем два связывающих модуля были слиты с помощью линкера. Полученный биспецифический формат иногда называют "форматом Моррисона". В этом случае первый связывающий домен нацелен на цепь V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, а второй связывающий домен нацелен на EGFr (см. пример 20).

Второй пример; мультиспецифическое антитело к V δ 1-EGFr.

В этом примере один связывающий домен (с первой мишенью) включает вариабельный домен антитела (в частности, содержащий VH и родственные домен VL), в то время как второй связывающий домен (со второй мишенью) содержит связывающий домен внутри константного домена тяжелой цепи (CH1-CH2-CH3) (см. также EP2546268 A1, табл. 1 / EP3487885 A1). Полученный биспецифический продукт включает первый связывающий домен, нацеленный на цепь V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, и второй связывающий домен, нацеленный на рецептор EGF (см. пример 20).

Третий пример; мультиспецифическое антитело к V δ 1-CD19.

В этом примере один связывающий домен (с первой мишенью) содержал интактные фрагменты антитела; в частности, VH-CH1-CH2-CH3 и родственные партнеры VL-CL, в то время как второй домен связывания (со второй мишенью) включает фрагмент антитела; в частности, формат scFv. Затем два связывающих модуля были слиты с помощью линкера. Для этого примера полученная биспецифичность включала первый связывающий домен, нацеленный на цепь V δ 1 TCR $\gamma\delta$, и второй связывающий домен, нацеленный на CD19 (см. пример 21).

Примечательно, что во всех указанных примерах, содержащих по меньшей мере один (первый) связывающий домен, нацеленный на цепь V δ 1 TCR $\gamma\delta$, по меньшей мере один второй домен, нацеленный на второй эпитоп, наблюдали повышенную функциональность по сравнению с контролями и составными частями (см. примеры 20 и 21 в данном документе).

В совокупности эти неограничивающие примеры подчеркивают гибкость антител или их фрагментов, как описано в данном документе. Эти неограничивающие примеры описывают подход с использованием мультиспецифических антител, при котором антитела или их фрагменты, нацеленные на цепь V δ 1 зародышевой линии (аминокислоты 1-90 SEQ ID NO: 1), могут быть дополнительно усилены путем объединения со вторыми связывающими доменами с образованием мультиспецифических антител. В каче-

стве неограничивающих примеров в настоящем документе представлены мультиспецифические антитела с расширенной функциональностью, которые содержат связывающие домены, содержащие интактные антитела (VH-CH1-CH2-CH3 и VL-CL), и/или переменные домены (VH и родственные VL или VH-CH1, и родственные VL-CL), и/или фрагменты антител (scFv).

В одном варианте реализации мультиспецифические связывающие домены антитела, которые нацелены на цепь V δ 1 $\gamma\delta$ TCR (первая мишень), могут включать (i) один или два или более доменов связывания антител, каждый из которых содержит тяжелую цепь (VH-CH1-CH2-CH3) и партнер родственной легкой цепи (VL-CL) и/или (ii) один или два или более домена связывания антитела, каждый из которых содержит переменный домен тяжелой цепи (VH или VH-CH1) и партнер переменного домена родственной легкой цепи (VL, или VL-VC) и/или (iii) один, два или более доменов связывания антитела, каждый из которых содержит фрагмент антитела, содержащий CDR.

В одном варианте реализации предложено мультиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере один, полученный из первого антитела, связывающий домен, нацеленный на цепь V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, и который функционально связан по меньшей мере с одним вторым связывающим доменом антитела, нацеленным на второй эпитоп. Необязательно, указанные связывающие домены содержат по меньшей мере один или более VH и родственных связывающих доменов VL, или один или более VH-CH1-CH2-CH3 и родственных связывающих доменов VL-CL, или один или более связывающих доменов фрагментов антитела. Необязательно, указанный второй связывающий домен нацелен на второй эпитоп, связанный с клеточной поверхностью клетки или экспрессируемый на ней. Необязательно, указанный второй эпитоп расположен на полипептиде клеточной поверхности, связанном с больной клеткой или опухолевой клеткой, или инфицированной вирусом клеткой, или клеткой аутоиммунной ткани. Необязательно, указанный второй эпитоп или эпитопы расположены на антигенах CD19 или EGFr, связанных с заболеванием и клеточным типом. Необязательно, указанное мультиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере один полученный из первого антитела связывающий домен, нацеленный на цепь V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, функционально связано со вторым связывающим доменом, связывающим рецептор EGF, и содержит одну или более из следующих модификаций тяжелой цепи в соответствии с номенклатурой EU; L358T и/или T359D, и/или K360D, и/или N361G, и/или Q362P, и/или N384T, и/или G385Y, и/или Q386G, и/или D413S, и/или K414Y, и/или S415W, и/или Q418Y, и/или Q419K.

Необязательно, мультиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере один полученный из первого антитела связывающий домен, нацеленный на цепь V δ 1 $\gamma\delta$ TCR, функционально связано со вторым связывающим доменом, содержащим SEQ ID NO: 147 или SEQ ID NO: 148, или SEQ ID NO: 149, или SEQ ID NO: 157, или их функционально эквивалентные связывающие варианты, нацеленные либо на EGFr, либо на CD19. Необязательно, полученные мультиспецифические антитела содержат SEQ ID NO: 140 или SEQ ID NO: 141, или SEQ ID NO: 142, или SEQ ID NO: 144, или SEQ ID NO: 145, или SEQ ID NO: 146, или SEQ ID NO: 158 или SEQ ID NO: 159. Указанные объекты включены в настоящее описание в качестве неограничивающих новых композиций для облегчения понимания.

В одном аспекте изобретения мультиспецифические антитела по изобретению можно использовать в терапевтически эффективных количествах для лечения заболевания или расстройства, а именно облегчения по меньшей мере одного признака или симптома заболевания, или расстройства.

В одном варианте реализации предложен способ выбора, характеристики или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$ TCR в формате мультиспецифического антитела, причем указанное мультиспецифическое антитело применяется к клеткам V δ 1+ для измерения эффекта, обеспечиваемого указанным мультиспецифическим антителом на клетки V δ 1+ (например, на указанный фенотип V δ 1+, и/или цитотоксичность, и/или специфичность к больным клеткам, и/или их усиление).

Полинуклеотиды и векторы экспрессии

В одном аспекте изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий антитело к V δ 1, или мультиспецифическое антитело, или фрагмент по изобретению. В одном варианте реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, идентичной по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% последовательности SEQ ID NO: 99-110. В одном варианте реализации вектор экспрессии содержит область VH SEQ ID NO: 99-110. В другом варианте реализации вектор экспрессии содержит область VL SEQ ID NO: 99-110. В дополнительном варианте реализации полинуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 99-110. В дополнительном аспекте предложена кДНК, содержащая указанный полинуклеотид.

В одном аспекте изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий антитело к V δ 1 или его фрагмент по изобретению. В одном варианте реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, идентичной по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% последовательности SEQ ID NO: 99-101 или 105-108. В одном варианте реализации вектор экспрессии содержит область VH SEQ ID NO: 99-101 или 105-108. В другом варианте реализации вектор экспрессии содержит область

VL SEQ ID NO: 99-101 или 105-108. В дополнительном варианте реализации полинуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 99-101 или 105-108. В дополнительном аспекте предложена кДНК, содержащая указанный полинуклеотид.

В одном варианте реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, идентичной по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% последовательности SEQ ID NO: 99-101. В одном варианте реализации вектор экспрессии содержит область VH SEQ ID NO: 99-101. В другом варианте реализации вектор экспрессии содержит область VL SEQ ID NO: 99-101. В дополнительном варианте реализации полинуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 99-101. В дополнительном аспекте предложена кДНК, содержащая указанный полинуклеотид.

В одном аспекте изобретения предложен полинуклеотид, содержащий или состоящий из последовательности, идентичной по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% любой части последовательности SEQ ID NO: 99-110, которая кодирует CDR1, CDR2 и/или CDR3 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина. В одном варианте реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, идентичной по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% любой части последовательности SEQ ID NO: 99-101 или 105-108, которая кодирует CDR1, CDR2 и/или CDR3 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина. В одном варианте реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, идентичной по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% любой части последовательности SEQ ID NO: 99-101, которая кодирует CDR1, CDR2 и/или CDR3 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина.

В одном аспекте изобретения предложен полинуклеотид, содержащий или состоящий из последовательности, идентичной по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% любой части последовательности SEQ ID NO: 99-110, которая кодирует FR1, FR2, FR3 и/или FR4 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина. В одном варианте реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, идентичной по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% любой части последовательности SEQ ID NO: 99-101 или 105-108, который кодирует FR1, FR2, FR3 и/или FR4 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина. В одном варианте реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, идентичной по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% любой части последовательности SEQ ID NO: 99-101, которая кодирует FR1, FR2, FR3 и/или FR4 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина.

Полинуклеотиды и векторы экспрессии по изобретению также могут быть описаны со ссылкой на кодируемую аминокислотную последовательность. Следовательно, в одном варианте реализации полинуклеотид включает или состоит из последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 62-85. В одном варианте реализации вектор экспрессии содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 62-73. В другом варианте реализации вектор экспрессии содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 74-85.

Для экспрессии антител или их фрагментов полинуклеотиды, кодирующие частичные или полно-размерные легкие и тяжелые цепи, как описано в данном документе, вставляют в векторы экспрессии, так что гены функционально связаны с последовательностями, контролирующими транскрипцию и трансляцию. Следовательно, в одном аспекте изобретения предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность, как определено в данном документе. В одном варианте реализации вектор экспрессии содержит область VH SEQ ID NO: 99-110, например, SEQ ID NO: 99, 100, 101, 105, 106, 107 или 108. В другом варианте реализации вектор экспрессии содержит область VL SEQ ID NO: 99-110, например, SEQ ID NO: 99, 100, 101, 105, 106, 107 или 108.

Следует понимать, что описанные в данном документе нуклеотидные последовательности содержат дополнительные последовательности, кодирующие аминокислотные остатки, чтобы способствовать трансляции, очистке и обнаружению, однако альтернативные последовательности могут использоваться в зависимости от используемой системы экспрессии. Например, начальные (5'-конец) девять нуклеотидов SEQ ID NO: 99-110 и конечные (3'-конец) 36 нуклеотидов SEQ ID NO: 99-100, 102-103, 105-110 или конечные (3'-конец) 39 нуклеотидов SEQ ID NO: 101 и 104 представляют собой необязательные последовательности. Эти необязательные последовательности могут быть удалены, изменены или заменены, если приняты альтернативные стратегии дизайна, трансляции, очистки или обнаружения.

Мутации могут быть сделаны в ДНК или кДНК, которые кодируют полипептиды, которые не имеют аминокислотной последовательности полипептида, но которые обеспечивают предпочтительные кодоны для трансляции в конкретном хозяине. Известны предпочтительные кодоны для трансляции нук-

леиновой кислоты в, например, *E. coli* и *S. cerevisiae*, а также млекопитающих, особенно человеке.

Мутация полипептидов может быть достигнута, например, путем замен, добавлений или делеций нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Замены, добавления или делеции в нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, могут быть введены многими способами, включая, например, подверженную ошибкам ПЦР, перетасовку, олигонуклеотид-направленный мутагенез, сборочную ПНР, ПЦР-мутагенез, мутагенез *in vivo*, кассетный мутагенез, рекурсивный ансамблевой мутагенез, экспоненциальный ансамблевой мутагенез, сайт-специфический мутагенез, повторная сборка генов, искусственный синтез гена, мутагенез с насыщением сайта гена (GSSM), повторная сборка синтетической лигатуры (SLR) или комбинацией этих методов. Модификации, добавления или делеции в нуклеиновую кислоту также могут быть введены способом, включающим рекомбинацию, рекурсивную рекомбинацию последовательностей, мутагенез фосфотиоат-модифицированной ДНК, урацил-содержащий матричный мутагенез, дуплексный мутагенез с разрывом, мутагенез с репарацией точечного несоответствия, мутагенез в штамме-хозяине с дефицитом репарации, химический мутагенез, радиогенный мутагенез, делеционный мутагенез, рестрикционно-селективный мутагенез, рестрикционно-очищающий мутагенез, ансамблевой мутагенез, создание мультимеров химерных нуклеиновых кислот или их комбинацией.

В частности, может использоваться искусственный синтез генов. Ген, кодирующий полипептид по изобретению, может быть получен синтетически, например, путем твердофазного синтеза ДНК. Целые гены могут быть синтезированы *de novo* без необходимости в матричной ДНК-предшественнице. Для получения желаемого олигонуклеотида строительные блоки последовательно связывают с растущей олигонуклеотидной цепью в порядке, требуемом последовательностью продукта. По завершении сборки цепи продукт переводится из твердой фазы в раствор, снимается защита и выделяется. Продукты могут быть выделены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для получения желаемых олигонуклеотидов с высокой чистотой.

Векторы экспрессии включают, например, плазмиды, ретровирусы, космиды, искусственные хромосомы дрожжей (YAC) и эписомы, полученные из вируса Эпштейна-Барра (EBV). Полинуклеотид лигируют в вектор, так что последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию, в векторе выполняют предназначенную для них функцию регулирования транскрипции и трансляции полинуклеотида. Последовательности экспрессии и/или контроля могут включать промоторы, энхансеры, терминаторы транскрипции, стартовый кодон (т.е. ATG) 5' для кодирующей последовательности, сигналы сплайсинга для интронов и стоп-кодоны. Вектор экспрессии и последовательности контроля экспрессии выбираются так, чтобы они были совместимы с используемой клеткой-хозяином для экспрессии. SEQ ID NO: 99-110 содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие одноцепочечные переменные фрагменты по изобретению, содержащие область VH и область VL, соединенные синтетическим линкером (кодирующим SEQ ID NO: 98). Следует понимать, что полинуклеотиды или векторы экспрессии по изобретению могут содержать область VH, область VL или обе (необязательно, включая линкер). Следовательно, полинуклеотиды, кодирующие области VH и VL, могут быть вставлены в отдельные векторы, альтернативно последовательности, кодирующие обе области, вставлены в один и тот же вектор экспрессии. Полинуклеотид(ы) вставляют в вектор экспрессии стандартными методами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции полинуклеотида и вектора или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют).

Подходящим вектором является тот, который кодирует функционально полную последовательность иммуноглобулина CH или CL человека с соответствующими сайтами рестрикции, сконструированными таким образом, что любая последовательность VH или VL может быть легко вставлена и экспрессирована, как описано в данном документе. Вектор экспрессии может также кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции антитела (или его фрагмента) из клетки-хозяина. Полинуклеотид можно клонировать в вектор таким образом, чтобы сигнальный пептид был связан в рамке считывания с аминоконцом антитела. Сигнальный пептид может быть сигнальным пептидом иммуноглобулина или гетерологичным сигнальным пептидом (т.е. сигнальным пептидом из неиммуноглобулинового белка).

В одном аспекте изобретения предложена клетка (например, клетка-хозяин), содержащая полинуклеотид или вектор экспрессии, как определено в данном документе. Следует понимать, что клетка может содержать первый вектор, кодирующий легкую цепь антитела или его фрагмента, и второй вектор, кодирующий тяжелую цепь антитела или его фрагмент. Альтернативно, тяжелая и легкая цепи кодируются одним и тем же вектором экспрессии, введенным в клетку.

В одном варианте реализации полинуклеотид или вектор экспрессии кодирует мембранный якорь или трансмембранный домен, слитый с антителом или его фрагментом, причем антитело или его фрагмент представлены на внеклеточной поверхности клетки.

Трансформация может осуществляться любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяин. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают опосредованную декстраном трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, опосредованную полибреном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы, биолиственную инъекцию и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в клетки млекопитающих ви-

русными векторами.

Клеточные линии млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области техники и включают множество иммортализованных клеточных линий, доступных из Американской коллекции типовых культур (ATCC). К ним относятся, среди прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NSO, SP2, клетки HeLa, клетки почек детеныша хомячка (BHK), клетки почек обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3 и ряд других клеточных линий. Клетки-хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, крупного рогатого скота, лошади и хомяка. Линии клеток особого предпочтения выбираются путем определения того, какие линии клеток имеют высокие уровни экспрессии. Другие линии клеток, которые можно использовать, представляют собой линии клеток насекомых, такие как клетки Sf9, клетки земноводных, клетки бактерий, клетки растений и клетки грибов. Антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как фрагменты scFv и Fv, могут быть выделены и экспрессированы в *E. coli* с использованием способов, известных в данной области техники.

Антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточно-го для обеспечения экспрессии антитела в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, секреции антитела в культуральную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Антитела можно выделить из культуральной среды с помощью стандартных методов очистки белков.

Антитела (или фрагменты) по данному изобретению могут быть получены и обработаны с использованием методов, раскрытых, например, в Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2012) 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридомной технологии путем слияния В-клетки, продуцирующей специфические антитела, с клеткой миеломы (В-клеточное онкологическое заболевание), выбранной из-за ее способности расти в культуре ткани и из-за ее отсутствия синтеза цепи антитела.

Моноклональное антитело, направленное против определенного антигена, можно, например, получить

а) иммортализируя лимфоциты, полученные из периферической крови животного, ранее иммунизированного определенным антигеном, бессмертными клетками и предпочтительно клетками миеломы, с целью образования гибридомы,

б) культивируя образовавшиеся иммортализованные клетки (гибридомы) и выделяя клетки, продуцирующие антитела, имеющие желаемую специфичность.

В качестве альтернативы использование гибридомной клетки не требуется. Антитела, способные связываться с целевыми антигенами, как описано в данном документе, могут быть выделены из подходящей библиотеки антител с помощью обычных способов известных в данной области техники, например, с использованием технологии фагового дисплея, дрожжевого дисплея, рибосомного дисплея или дисплея млекопитающих. Соответственно, моноклональные антитела могут быть получены, например, с помощью способа, включающего следующие стадии:

а) клонирование в векторы, особенно в фаги и, в частности, нитчатые бактериофаги, последовательности ДНК или кДНК, полученных из лимфоцитов, особенно лимфоцитов периферической крови животного (подходящим образом предварительно иммунизированных определенными антигенами),

б) трансформацию прокариотических клеток указанными выше векторами в условиях, позволяющих продуцировать антитела,

с) отбор антител путем отбора по сродству к антигену,

д) выделение антител, имеющих желаемую специфичность.

Необязательно, изолированные полинуклеотидные кодирующие антитела или их фрагменты, как описано в данном документе, и которые связываются с цепью V δ 1 $\gamma\delta$, также могут быть легко произведены для получения достаточных количеств для применения в качестве лекарственных средств для ослабления признаков или симптомов заболевания. При использовании в качестве лекарственного средства таким образом, как правило, интересующие полинуклеотиды сначала оперативно связывают с вектором экспрессии или кассетой экспрессии, предназначенной для экспрессии указанных антител или их фрагментов у субъекта или пациента. Такие кассеты экспрессии и способы доставки полинуклеотидов или того, что иногда называют лекарствами "на нуклеиновой основе", хорошо известны в данной области техники. Недавний обзор способов см. в Hollevoet and Declerck (2017) *J. Transl. Med.* 15(1): 131.

Фармацевтические композиции

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена композиция, содержащая антитело или его фрагмент, как определено в данном документе. В таких вариантах реализации композиция может содержать антитело, необязательно в комбинации с другими вспомогательными веществами. Также включены композиции, содержащие один или более дополнительных активных агентов (например, активные агенты, подходящие для лечения заболеваний, упомянутых в данном документе).

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его фрагмент, как определено в данном документе, вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем. Антитела по изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения субъекту. Обычно фармацевтическая композиция

включает антитело по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают один или более из следующих компонентов: вода, физиологический раствор, соли, забуференный фосфатом физиологический раствор, декстроза, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие вещества или небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность антитела, или его фрагмента.

Композиции по данному изобретению могут быть в различных формах. К ним относятся, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции имеют форму растворов для инъекций или инфузий.

Предпочтительный способ введения является парентеральным способом введения (например, внутривенным, подкожным, внутрибрюшинным, внутримышечным, интратекальным). В предпочтительном варианте реализации антитело вводят внутривенной инфузией или инъекцией. В другом предпочтительном варианте реализации антитело вводят внутримышечной или подкожной инъекцией.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства.

В объем изобретения входит использование фармацевтической композиции по изобретению в терапевтических способах лечения заболеваний, как описано в данном документе, в качестве дополнения или в сочетании с другими общепринятыми методами лечения, обычно используемыми при лечении таких заболеваний.

В дополнительном аспекте изобретения антитело, композицию или фармацевтическую композицию вводят последовательно, одновременно или отдельно по меньшей мере с одним активным агентом.

Способы лечения

Согласно дополнительному аспекту изобретения предложено выделенное антитело к Vδ1 или его фрагмент, как определено в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства. Ссылки в данном документе на антитело или его фрагмент "для применения" в качестве лекарственного средства или в терапии ограничиваются введением антитела или его фрагмента субъекту. Такие применения не включают введение антитела или его фрагмента в культуру клеток (т.е. *in vitro* или *ex vivo*), где указанная культура клеток или производный продукт клеточной терапии используется в качестве терапевтического средства.

В одном варианте реализации антитело к Vδ1 или его фрагмент предназначены для применения при лечении онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания. В одном варианте реализации изобретение представляет собой способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий стадию введения субъекту антитела к Vδ1 или его фрагмента. В различных вариантах реализации заболевание или расстройство представляет собой онкологическое заболевание, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание. В одном варианте реализации антитело к Vδ1 или его фрагмент предназначено для применения при лечении онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания, приводит к гибели больных клеток при сохранении здоровых клеток. В другом варианте реализации антитело или его фрагмент предназначены для лечения онкологического заболевания.

В одном варианте реализации антитело или его фрагмент предназначены для лечения онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания. В другом варианте реализации антитело или его фрагмент предназначены для лечения онкологического заболевания.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, как определено в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства. В одном варианте реализации фармацевтическая композиция предназначена для лечения онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания. В дополнительном варианте реализации фармацевтическая композиция предназначена для лечения онкологического заболевания.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложен способ модуляции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества изолированного антитела к Vδ1 или его фрагмента, как определено в данном документе. В различных вариантах реализации модуляция иммунного ответа у субъекта включает связывание или нацелива-

ние на $\gamma\delta$ Т-клетки, активацию $\gamma\delta$ Т-клеток, вызывая или увеличивая пролиферацию $\gamma\delta$ Т-клеток, вызывая или увеличивая размножение $\gamma\delta$ Т-клеток, вызывая или увеличивая дегрануляцию $\gamma\delta$ Т-клеток, вызывая или увеличивая активность уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток, вызывая или увеличивая активность уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при сохранении здоровых клеток, вызывая или увеличивая цитотоксичность $\gamma\delta$ Т, вызывая или увеличивая цитотоксичность $\gamma\delta$ Т при сохранении здоровых клеток, вызывая или увеличивая мобилизацию $\gamma\delta$ Т-клеток, увеличивая выживаемость $\gamma\delta$ Т-клеток, или повышение устойчивости к истощению $\gamma\delta$ Т-клеток.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложен способ лечения онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества изолированного антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе. Альтернативно вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции.

Согласно дополнительным аспектам изобретения предложено применение антитела или его фрагмента, как определено в данном документе, для производства лекарственного средства, например, для лечения онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

В одном варианте реализации антитело или его фрагмент вводят субъекту, у которого есть онкологическое заболевание, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, как определено в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства. В одном варианте реализации фармацевтическую композицию вводят субъекту, у которого есть онкологическое заболевание, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложен способ введения терапевтически эффективного количества выделенного антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе, субъекту, у которого есть онкологическое заболевание, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание. Альтернативно вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции.

Согласно дополнительным аспектам изобретения предложено использование антитела или его фрагмента, как определено в данном документе, для производства лекарственного средства, например, для введения субъекту, у которого есть онкологическое заболевание, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание.

В различных вариантах реализации онкологическое заболевание, которое можно лечить описанными способами и композициями, включает, помимо прочего, острый лимфобластный, острый миелоидный лейкоз, аденокарциному, онкологическое заболевание аппендикса, базальноклеточную карциному, онкологическое заболевание желчных протоков, онкологическое заболевание мочевого пузыря, онкологическое заболевание костей, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому, глиому ствола головного мозга, опухоль головного мозга, опухоль головного мозга, глиому ствола головного мозга, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль центральной нервной системы, эмбриональные опухоли центральной нервной системы, астроцитому мозжечка, астроцитому головного мозга/злокачественную глиому, краниофарингиому, эпендимобластому, эпендимому, медуллобластому, медуллоэпителиому, паренхиматозные опухоли пинеальной железы промежуточной дифференцировки, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластому, глиому зрительного пути и гипоталамуса, опухоли головного и спинного мозга, онкологическое заболевание молочной железы, бронхиальные опухоли, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, карцино-кишечную опухоль, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль центральной нервной системы, эмбриональные опухоли центральной нервной системы, лимфому центральной нервной системы, астроцитому мозжечка, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, онкологическое заболевание шейки матки, хордому, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелопролиферативные расстройства, онкологическое заболевание толстой кишки, колоректальное онкологическое заболевание, краниофарингому, кожную Т-клеточную лимфому, онкологическое заболевание пищевода, опухоли семейства Юинга, внегонадную герминогенную опухоль, онкологическое заболевание внепеченочных желчных протоков, внутриглазную меланому, ретинобластому, онкологическое заболевание желчного пузыря, онкологическое заболевание желудка (желудка), карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта (гист), опухоль зародышевых клеток, гестационную трофобластическую опухоль, глиому, глиому ствола головного мозга, глиому церебральную астроцитому, глиому зрительного пути и гипоталамуса, волосатоклеточный лейкоз, онкологическое заболевание головы и шеи, гепатоцеллюлярное онкологическое заболевание (печень), гистиоцитоз клеток Лангерганса, лимфому Ходжкина, гипофаренгальное онкологическое заболевание, глиому гипоталамического и зрительного пути, внутриглазную меланому, опухоли островковых клеток, онкологическое заболевание почек (почечных клеток), гистиоцитоз из клеток Лангерганса, онкологическое заболевание гортани, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, онкологическое заболева-

ние губы и полости рта, онкологическое заболевание печени, немелкоклеточное онкологическое заболевание легких, мелкоклеточное онкологическое заболевание легких, лимфому, связанную со СПИДом, лимфому Беркитта, кожную Т-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, макроглобулинемию Вальденстрема, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости и остеосаркому, медуллобластому, меланому, карциному клеток Меркеля, мезотелиому, метастатическое плоскоклеточное онкологическое заболевание шеи со скрытым началом, онкологическое заболевание ротовой полости, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому/новообразование плазматических клеток, микоз, фунгоиды, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелолиферативные заболевания, миелогенный лейкоз, миелолейкоз, острый миелолейкоз, множественный миелолейкоз, миелолиферативные расстройства, онкологическое заболевание придаточных пазух носа, онкологическое заболевание носоглотки, нейробластому, немелкоклеточное онкологическое заболевание легкого, онкологическое заболевание ротовой полости, онкологическое заболевание полости рта, онкологическое заболевание ротоглотки, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, онкологическое заболевание яичников, эпителиальное онкологическое заболевание яичников, герминогенную опухоль яичников, опухоль яичников с низким потенциалом злокачественности, онкологическое заболевание поджелудочной железы, онкологическое заболевание поджелудочной железы, папилломатоз, онкологическое заболевание паращитовидной железы, онкологическое заболевание полового члена, онкологическое заболевание глотки, феохромоцитому, паренхиматозные опухоли шишковидной железы промежуточной дифференцировки, пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль гипофиза, плазменная опухоль/множественную миелому, плевропульмональную бластому, первичную лимфому центральной нервной системы, онкологическое заболевание простаты, ректальное онкологическое заболевание, онкологическое заболевание клеток почки (почки), почечной лоханки и мочеточника, онкологическое заболевание дыхательных путей с участием гена *nut* на хромосоме 15, ретинобластому, рабдомиосаркому, онкологическое заболевание слюнной железы, саркому, опухоли семейства Юинга, саркому Капоши, саркому мягких тканей, саркому матки, синдром Сезари, онкологическое заболевание кожи (немеланома), онкологическое заболевание кожи (меланома), карциному кожи из клеток Меркель, мелкоклеточное онкологическое заболевание легких, онкологическое заболевание тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную саркому, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточное онкологическое заболевание шеи, онкологическое заболевание желудка (желудка), супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, Т-клеточную лимфому, онкологическое заболевание яичек, онкологическое заболевание горла, тимому и карциному тимуса, онкологическое заболевание щитовидной железы, переходноклеточное онкологическое заболевание почечной лоханки и мочеточника, гестационную трофобластическую опухоль, онкологическое заболевание уретры, онкологическое заболевание матки, саркому матки, онкологическое заболевание влагалища, онкологическое заболевание вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса. В различных вариантах реализации онкологическое заболевание, которое можно лечить описанными способами и композициями, лечат, в то время как здоровые клетки сохраняются.

В различных вариантах реализации воспалительные заболевания, которые можно лечить описанными способами и композициями, включают, но не ограничиваются ими, ахалазию, острый диссеминированный энцефаломиелит (ADEM), острую моторную аксональную невропатию, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), болезнь Аддисона, ожирение, *dolorosa*, болезнь Стилла у взрослых, болезнь Стилла с началом во взрослом возрасте, агаммаглобулинемия, наружная алопеция, амилоидоз, боковой амиотрофический склероз, анкилозирующий спондилит, анти-GBM/анти-TBM нефрит, анти-N-метил-D-аспаратный рецептор (анти-NMDA) энцефалит, антифосфолипидный синдром, антифосфолипидный синдром (APS, APLS), антисинтетазный синдром, антитубулярный нефрит базальной мембраны, апластическую анемию, атопическую аллергию, атопический дерматит, аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунные коморбидные заболевания, аутоиммунную дисапатию, аутоиммунный энцефаломиелит, аутоиммунную энтеропатию, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунный миокардит, аутоиммунную нейтропению, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный орхит, аутоиммунный панкреатит (AIP), аутоиммунную периферическую невропатию, аутоиммунный полиэндокринный синдром (APS) типа 1, аутоиммунный полиэндокринный синдром (APS) типа 2, аутоиммунный полиэндокринный синдром (APS) типа 3, аутоиммунную ретинопатию, аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру, аутоиммунный тиреоидит, аутоиммунную крапивницу, аутоиммунный увеит, аутоиммунный васкулит, аксональную и нейрональную невропатию (AMAN), бало-концентрический склероз, болезнь Бало, болезнь Бехчета, доброкачественный мукозальный пемфигоид, энцефалит Бикерстаффа, синдром Блау, булезный пемфигоид, болезнь Кастремана (CD), целиакию, болезнь Шагаса, синдром хронической усталости, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIDP), хроническую обструктивную болезнь легких, хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит (CRMO), синдром Хурга-Стросса (CSS) или эозинофильный гранулематоз (EGPA), рубцовый пемфигоид, синдром Когана, болезнь холодовых агглютининов, дефицит компонента комплемента 2, ком-

плексный регионарный болевой синдром, врожденную блокаду сердца, соединительной ткани, системный и мультиорганный, контактный дерматит, миокардит Коксаки, синдром CREST, болезнь Крона, синдром Кушинга, кожный лейкоцитокластический ангиит, болезнь Дего, герпетический дерматит, дерматомиозит, болезнь Девича (оптический нейромиеелит), сахарный диабет I типа, пищеварительную систему, дискоидную волчанку, синдром Дресслера, волчанку вызванную лекарственными средствами, экзему, эндометриоз, артрит, связанный с энтезитом, эозинофильный эзофагит (ЕоЕ), эозиноэнтрофильный фасцит эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (EGPA), эозинофильную пневмонию, приобретенный буллезный эпидермолиз, узловатую эритему, эритробластоз плода, эзофагеальную ахалазию, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, синдром Эванса, экзокрин, синдром Фелти, прогрессирующую оссифицирующую фибродисплазию, фибромиалгию, фиброзный алвеолит, гастрит, гастрокишечный пемфигиод, гигантоклеточный артериит (темпоральный артериит), гигантоклеточный миокардит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, гранулематоз с полиангиитом, офтальмопатия Грейвса, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, энцефалопатию Хашимото, гемолитическую анемию, болезнь Шенлейн-Геноха (HSP), *Herpes gestationis* или пемфигиод беременных (PG), суппуративный гидраденит (HS) (*Acne Inversa*), гипогаммаглобулинемию, идиопатический гигантоклеточный миокардит, идиопатические воспалительные демиелинизирующие заболевания, идиопатический фиброз легких, IgA-нефропатию, IgA-васкулит (IgAV), IgA-ассоциированную болезнь, IgA-ассоциированную склерозирующую болезнь, иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), миозит с включенными тельцами (IBM), воспалительное заболевание кишечника, промежуточный увеит, интерстициальный цистит (IC), интерстициальное заболевание легких, синдром IPEx, ювенильный артрит, ювенильный диабет (диабет I типа), ювенильный миозит (JM), болезнь Кавасаки, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, склеротический лишай, лишайный конъюнктивит, линейную болезнь IgA (LAD), волчанку, волчаночный нефрит, волчаночный васкулит, хроническую болезнь Лайма, синдром Маджида, болезнь Меньера, микроскопический полиангиит (MPA), смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), язву Мурена, *Morphea*, болезнь Мухи-Габерманна, мультифокальную моторную нейропатию (MMN) или MMNCB, рассеянный склероз, *Myasthenia gravis*, миокардит, миозит, нарколепсию, неонатальную волчанку, нервную систему, нейромиеелит зрительного нерва, нейромиотонию, нейтропению, глазной рубцовый пемфигиод, опсо-миоклональный синдром, оптический нейрит, тиреоидит Орда, синдром Ошторана, палиндромный ревматизм (PR), паранеопластическую дегенерацию мозжечка (PCD), пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), синдром Парри-Ромберга, синдром Парсонажа-Тернера, парс-планит (периферический увеит), детское аутоиммунное, невропсихиатрическое расстройство связанное с *Streptococcus* (PANDAS), воспалительная болезнь таза (PID), пемфигиод, *Pemphigus vulgaris*, периферическая нейропатия, перивенальный энцефаломиелит, пернициальная анемия (PA), острый лихеноидный и вариолиформный параспориоз, РОEMS-синдром, узелковый полиартериит, полигландулярные синдромы I, II, III типа, ревматическую полимиалгию, полимиозит, постмиокардиальный синдром, постпериотомию, первичный билиарный холангит (PBC), первичный билиарный цирроз, первичный иммунодефицит, первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, прогрессирующую воспалительную нейропатию, псориаз, псориатический артрит, чистую эритроцитарную аплазию (PRCA), гангренозную пиодермию, энцефалит Расмуссена, феномен Рейно, реактивный артрит, симпатическую рефлекторную дистрофию, рецидивирующий хондрит, синдром беспокойных ног (RLS), ретроперитонеальный фиброз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, ревматоидный васкулит, саркоидоз, шизофрению, синдром Шмидта, синдром Шницлера, склерит, склеродермию, сывороточную болезнь, синдром Сьегрена, аутоиммунность спермы и яичек, спондилоартропатия, синдром закованного человека (SPS), подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, синдром Свита, хорею Сиденхама, симпатическую офтальмию (SO), системную красную волчанку (SLE), артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромбоцитопению, тромбоцитопеническую пурпуру (TTP), тироидную железу, синдром Толоза-Ханта (THS), поперечный миелит, диабет I типа, язвенный колит (ЯК), недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), недифференцированная спондилоартропатия, *Urticarial vasculitis*, крапивница, увеит, васкулит, витилиго и болезнь Фогта-Коянаги-Харада. В различных вариантах реализации воспалительное заболевание, которое можно лечить описанными способами и композициями, лечат, в то время как здоровые клетки сохраняются.

В различных вариантах реализации инфекционное заболевание, которое можно лечить описанными способами и композициями, включает, помимо прочего, инфекцию вызванную *Acinetobacter*, актиномикоз, острый вялый миелит (AFM), африканскую сонную болезнь (африканский трипаносомоз), СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита), инфекцию вызванную амёбой, амёбиаз, инфекцию вызванную *Anaplasma phagocytophilum*, анаплазмоз, ангиостронгилиоз, анизакиаз, сибирскую язву, арбовирусные заболевания, нейроинвазивные и неинвазивные, инфекцию вызванную *Arcanobacterium haemolyticum*, аргентинский геморрагический вирус, *Ascariasis*, *Aspergillosis*, инфекцию вызванную астровирусом, птичий грипп, бабезиоз, инфекцию вызванную *Bacillus cereus*, бактериальную инфекцию, бактериальный менингит, бактериальную пневмонию, бактериальный вагиноз, инфекцию вызванную бактериями, балантидиаз, бартонеллез, инфекцию вызванную *Baylisascaris*, вирусную инфекцию ВК, черную

пиедру, бластоцистоз, боливийскую геморрагическую лихорадку, ботулизм, ботулизм (пищевой), ботулизм (детский), ботулизм (прочее), ботулизм (рана), бразильскую геморрагическую лихорадку, бруцеллез, бубонную чуму, инфекцию вызванную *Burkholderia*, язву Бурули, калицивирусную инфекцию (норовирус и саповирус), вирусные заболевания калифорнийской серогруппы, кампилобактер, кампилобактериоз, *Candida auris*, клинический, кандидоз (монилиаз; молочница), капилляриоз, продуцирующие карбапенемазу карбапенем-устойчивые *Enterobacteriaceae* (CP-CRE), карбапенем-устойчивые инфекции (CRE/CRPA), болезнь Карриона, болезнь кошачьих царапин, целлюлит, болезнь Шагаса (трипаносомоз), шанкроид, ветряную оспу, инфекцию вызванную вирусом Чикунгунья (Чикунгунья), *Chlamydia*, *Chlamydia trachomatis*, инфекцию вызванную *Chlamydia pneumoniae*, холеру, хромобластомикоз, хитридиомикоз, цигуатеру, клонорхоз, колит *Clostridium difficile*, инфекцию вызванную *Clostridium Difficile*, *Clostridium perfringens*, грибковую инфекцию вызванную *Coccidioidomycosis* (лихорадка долины), лихорадку вызванную колорадским клещом (CTF), простуду (острый вирусный ринофарингит; *Acute coxyza*), врожденный сифилис, конъюнктивит, COVID-19 (коронавирусная болезнь 2019), CP-CRE, *Enterobacter spp.*, CP-CRE, *Escherichia coli* (*E. coli*), CP-CRE, *Klebsiella spp.*, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, трансмиссивную губчатую энцефалопатию (CJD), болезнь Крейтцфельдта-Якоба (CJD), крымско-конголезскую геморрагическую лихорадку (CCHF), корковую чесотку, *Cryptococcosis*, криптоспориоз (*Crypto*), кожную мигрирующую личинку (CLM), *Cyclospora*, циклоспориоз, цистицеркоз, цитомегаловирусную инфекцию, вирусные инфекции денге, денге, 1,2,3,4 (лихорадка денге), болезнь, похожую на денге, инфекцию *Desmodemus*, диарею, диенамебиоз, дифтерию, дифиллоботриоз, дракункулез, *E. coli*, инфекцию *E. coli*, токсин-продуцирующую шигу (STEC), вирусную болезнь восточного конского энцефалита, геморрагическую лихорадку Эбола (Эбола), эхинококкоз, инфекцию вызванную *Ehrlichia chaffeensis*, инфекцию вызванную *Ehrlichia ewingii*, эрлихиоз, анаплазмоз, энцефалит, арбовирусный или параинфекционный, энтеробиоз (острица), энтерококковую инфекцию, энтеровирусную инфекцию, D68 (EV-D68), энтеровирусную инфекция, неполиомиелитную (неполиомиелитно), эпидемический тиф, вирус Эпштейна - Барра инфекционный моноклеоз (Моно), инфекционную эритему (пятая болезнь), *Exanthem subitum* (шестая болезнь), фасциолас, фасциолопсоз, фатальную семейную бессонницу (FFI), пятую болезнь, филяриатоз, грипп (сезонный), пищевое отравление, пищевое отравление *Clostridium perfringens*, свободноживущую амебную инфекцию, грибковую инфекцию, инфекцию *Fusobacterium*, газовую гангрену (клостридиальный мионекроз), генитальный герпес, генитальные бородавки, геотрихоз, немецкая корь, синдром Герстмана-Штреусслера-Шейнкера (GSS), гиардиаз, сап, гнатостомоз, гонорею, паховую гранулему, паховую гранулему (донованоз), стрептококковую инфекцию группы А, стрептококк группы А, стрептококковую инфекцию группы В, вирус гуанарито, болезнь *Haemophilus Influenza*, типа В (Hib или Н-грипп), гемофильную инфекция, болезнь рук, ног и рта (HFMD), болезнь Хансена, хантавирусную инфекцию, хантавирусный легочный синдром (HPS), болезнь, вызванную вирусом Heartland, инфекцию *Helicobacter pylori*, гемолитико-уремический синдром (HUS), геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (HFRS), инфекцию вызванную вирусом Хендры, гепатит А (Нер А), гепатит В (Нер В), гепатит С (Нер С), гепатит D (гепатит D), гепатит Е (Нер Е), герпес, вирус герпеса В, простой герпес, опоясывающий лишай, опоясывающий лишай VZV (опоясывающий лишай), Hib-инфекцию, гистоплазмозную инфекцию (гистоплазмоз), анкилостомоз, HPV (вирус папилломы человека), бокавирусную инфекцию человека, эрлихиоз *ewingii* человека, гранулоцитарный анаплазмоз человека (HGA), иммунодефицит человека/СПИД (ВИЧ/СПИД), метапневмовирусную инфекцию человека, моноцитарный эрлихиоз человека, инфекцию, вызванную вирусом папилломы человека (HPV), инфекцию вызванную вирусом парагриппа человека, гиенолепидоз, импетиго, грипп (грипп), грипп (сезонный), инвазивную пневмококковую инфекцию, изоспориоз, вирус Юнина, синдром Кавасаки кератит, инфекцию *Kingella kingae*, куру, лихорадку Ласса, вирус Ласса, легионеллез (болезнь легионеров), лейшманиоз, проказу (болезнь Гансенса), лептоспироз, листериоз (листерию), вирус Луджо, болезнь Лайма, лимфатический филяриатоз (слоновая болезнь), лимфатический хориоменингит (LCMV), венерическую лимфогранулему (LGV), вирус Мачупо, малярию, вирусную инфекцию Марбург, корь, мелиоидоз (болезнь Уитмора), менингит, менингит - бактериальный, менингит - вирусный, менингококковую инфекцию, метагонимиоз, микроспориоз, ближневосточный респираторный синдром (MERS), контагиозный моллюск (MC), оспу обезьян, моноклеоз, болезнь, передаваемую комарами, MRSA, эпидемический паротит, мышинный тиф (эндемический тиф), мицетому, инфекция вызванную *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, миаз, *Neisseria meningitidis*, неонатальный конъюнктивит (*Ophthalmia neonatorum*), вирусную инфекцию Nipah, нокардиоз, норовирус, онхоцеркоз (речная слепота), описторхозакомиоз, вирус орфа (болезнь рта), паракокцидиоз, парагонимоз, паралитическое отравление моллюсками (паралитическое отравление моллюсками, *Ciguatera*), пастереллез, PEP, паразитарная инфекция, коклюш (коклюш), розовый глаз, пневмококковую болезнь, пневмококковую инфекцию, пневмоцистную пневмонию (PCP), пневмонию, пневмонийную чуму, полиомиелит (полио), полиомиелит, паралитический, полиовирусную инфекцию, лихорадку Понтиак, болезнь, вызванную вирусом Повассана, инфекцию *Prevotella*, первичный амебный менингоэнцефалит (ПАМ), прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию, протозойную инфекцию, пситтакоз (лихорадка попугаев), гнойничковые заболевания (оспа, оспа обезьян, коровья оспа), бешенство, енотовидные круглые черви, лихорадку от укусов крыс, заболевания вызванные водой, ре-

лапсирующую лихорадку, респираторную инфекцию вызванную синцитальным вирусом, синдром Рея, риноспоридиоз, риновирусную инфекцию, инфекцию вызванную риккетсиями, риккетсиоз, риккетсиоз (пятнистая лихорадка Скалистых гор), лихорадку Рифт-Валли (RVF), стригущий лишай, ротавирусную инфекцию, краснуху, вирус сабии, сальмонеллу, инфекцию вызванную *Salmonella Paratyphi*, инфекцию вызванную *Salmonella Typhi*, сальмонеллез, SARS (тяжелый острый респираторный синдром), чесотку, скарлатину, шистосомоз, скомброид, сепсис, септический шок, септическую чуму, тяжелый острый респираторный синдром (SARS), *Escherichia coli*, продуцирующие токсин шига, шигеллу, шигеллез, опоясывающий лишай, опоясывающий лишай (герпес zoster), оспу, язвы во рту (вирус Orf), споротрихоз, пятнистый риккетсиоз, болезнь, вызванную вирусом энцефалита Сент-Луиса, стафилококковую инфекцию, стафилококковую инфекцию (метициллин-резистентная (MRSA)), стафилококковое пищевое отравление, стафилококковую инфекцию (промежуточный ванкомицин (VISA)), стрептококковую инфекцию, стрептококковую болезнь, группа А (инвазивная) (стрептококковая инфекция, А (инвазивная)), стрептококковую болезнь, группа В (стрептококковая инфекция-А), синдром токсического стрептококкового шока, стронгилоидоз, подострый склерозирующий панэнцефалит, сифилис, тениоз, столбнячную инфекцию, клещевые заболевания, *Tinea barbae*, *Tinea capitis*, *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea manuum*, *Tinea nigra*, *Tinea pedis*, *Tinea unguium*, *Tinea versicolor*, синдром токсического шока, токсокароз (мигрирующая глазная личинка (OLM)), токсокароз (висцеральная мигрирующая личинка (VLM)), токсоплазмоз, трахома, трихинеллез, трихомониаз, трихонозную инфекцию (трихоноз), тризуриаз (инфекция власоглавом), туберкулез (ТБ), туляремию (кроличья лихорадка), брюшной тиф, брюшной тиф, группа D, сыпной тиф, сыпной тиф, инфекция *Ureaplasma urealyticum*, вагиноз, лихорадку долины, вариант болезни Крейтцфельдта - Якоба (vCJD, nvCJD), ветряную оспу (ветряную оспу), венесуэльский энцефалит лошадей, венесуэльская геморрагическая лихорадка, холерный вибрион (инфекция, инфекцию вызванную *Vibrio parahaemolyticus*, инфекцию вызванную *Vibrio vulnificus*, вибриоз, вирусную инфекцию, вирусную геморрагическую лихорадку, вирусную геморрагическую лихорадку (Эбола, Ласса, Марбург), вирусную геморрагическую лихорадку (VHF), вирусную пневмонию, вирусную болезнь Западного Нила, вирусную болезнь западного конского энцефалита, белую пиедру (*tinea blanca*), коклюш, желтую лихорадку, йерсению (йерсениа), инфекцию, вызванную *Yersinia pseudotuberculosis*, йерсениоз, зeaспору, лихорадку Зика, вирус Зика, вирусная болезнь Зика, врожденную, вирусную болезнь Зика, неврожденную, вирусную инфекцию Зика (Зика), вирусную инфекцию Зика, врожденную, вирусную инфекцию Зика, не -врожденную и зигомикоз. В различных вариантах реализации инфекционное заболевание, которое можно лечить описанными способами и композициями, лечат, в то время как здоровые клетки сохраняются.

В одном варианте реализации изобретение представляет собой способ активации по меньшей мере одной $\gamma\delta$ Т-клетки у субъекта, включающий стадию введения антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте реализации изобретение представляет собой способ вызова или увеличения пролиферацию $\gamma\delta$ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте реализации изобретение представляет собой способ вызова или увеличения размножения $\gamma\delta$ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте реализации изобретение представляет собой способ вызова или увеличения дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте реализации изобретение представляет собой способ вызова или увеличения активности уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе. В одном варианте реализации изобретение представляет собой способ вызова или увеличения активности уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток у субъекта, в то время как здоровые клетки сохраняются, включающий стадию введения субъекту антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте реализации изобретение представляет собой способ вызова или увеличения цитотоксичности $\gamma\delta$ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе. В одном варианте реализации изобретение представляет собой способ вызова или увеличения цитотоксичности $\gamma\delta$ Т-клеток у субъекта, в то время как здоровые клетки сохраняются, включающий стадию введения субъекту антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте реализации изобретение представляет собой способ вызова или увеличения мобилизации $\gamma\delta$ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте реализации изобретение представляет собой способ увеличения выживаемости $\gamma\delta$ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте реализации изобретение представляет собой способ или увеличения сопротивляемости к размножению $\gamma\delta$ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту антитела к V δ 1 или его фрагмента, как определено в данном документе.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложен способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту антитела к V δ 1 или его фрагмента в количестве, эффективном для стимуляции иммунного ответа.

Применение антител или их фрагментов

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложено применение антитела к V δ 1 или его фрагмента, как описано в данном документе, для изучения распознавания антигена, активации, передачи сигнала или функции $\gamma\delta$ Т-клеток (в частности, V δ 1 Т-клеток). Как описано в данном документе, было показано, что антитела проявляют активность в анализах, которые можно использовать для исследования функции $\gamma\delta$ Т-клеток. Такие антитела также могут быть полезны для индукции пролиферации $\gamma\delta$ Т-клеток, поэтому их можно использовать в способах размножения $\gamma\delta$ Т-клеток (таких как V δ 1 Т-клетки).

Антитела, которые связываются с цепью V δ 1, можно использовать для обнаружения $\gamma\delta$ Т-клеток. Например, антитело можно пометить детектируемой меткой или репортерной молекулой, или использовать в качестве лиганда захвата для селективного обнаружения и/или выделения V δ 1 Т-клеток в образце. Меченые антитела находят применение во многих методах, известных в данной области техники, например, в иммуногистохимии и ИФА.

Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может быть радиоизотопом, таким как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентным или хемилюминесцентным фрагментом, таким как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или ферментом, таким как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Флуоресцентные метки, нанесенные на антитела по изобретению, можно затем использовать в методах сортировки клеток, активируемых флуоресценцией (FACS).

Таким образом, в различных вариантах реализации изобретение включает в себя способы модуляции $\gamma\delta$ Т-клеток *in vivo*, способы связывания $\gamma\delta$ Т-клеток, способы нацеливания на $\gamma\delta$ Т-клетки, способы активации $\gamma\delta$ Т-клеток, способы пролиферации $\gamma\delta$ Т-клеток, способы размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, способы обнаружения $\gamma\delta$ Т-клеток, способы, вызывающие дегрануляцию $\gamma\delta$ Т-клеток, способы, вызывающие активность уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток, способы выбора антител или их фрагментов, способы, включающие стадию введения антитела к $\gamma\delta$ или его фрагмента субъекту, как описано в данном документе.

Варианты реализации

Набор разделов, определяющих изобретение и его предпочтительные аспекты, выглядит следующим образом.

1. Способ лечения онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к V δ 1 или его фрагмента.

2. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент включает одно или более из:

CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: A1-A12 (из табл. 2); и/или

CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38-61.

3. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 2-13, например, SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11.

4. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26-37, например, SEQ ID NO: 32, 33, 34 или 35.

5. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38-49, например, SEQ ID NO: 44, 45, 46 или 47.

6. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 44.

7. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 45.

8. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит область

VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

29. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

30. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81.

31. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

32. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

33. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит область VH и область VL, при этом области VH и VL соединены линкером, таким как полипептидный линкер.

34. Способ по варианту реализации 33, в котором линкер имеет формат (Gly₄Ser)_n, где n = от 1 до 8.

35. Способ по варианту реализации 33 или варианту реализации, в котором линкер содержит линкер [(Gly₄Ser)_n(Gly₃AlaSer)_m]_p, где n, m и p = от 1 до 8.

36. Способ по варианту реализации 33 или по варианту реализации 35, в котором линкер содержит SEQ ID NO: 98.

37. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 86-97.

38. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 86-97.

39. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 86.

40. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 87.

41. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 88.

42. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 92.

43. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 93.

44. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 94.

45. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 95.

46. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент связывается с тем же или по существу с тем же эпитопом, что и антитело или его фрагмент, или конкурирует с ним, как определено в любом из вариантов реализации 1-45.

47. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к V δ 1 или его фрагмент включает связывание с эпитопом варибельной цепи дельта 1 (V δ 1) рецептора $\gamma\delta$ Т-клеток (TCR), содержащей один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислот 1-90 SEQ ID NO: 1.

48. Способ по варианту реализации 47, в котором эпитоп содержит по меньшей мере один из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 1.

49. Способ по варианту реализации 47 или по варианту реализации 48, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

50. Способ по любому из вариантов реализации 47-49, в котором эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

51. Способ по любому из вариантов реализации 47-50, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 5-20 и 62-77 SEQ ID NO: 1.

52. Способ по любому из вариантов реализации 47-51, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 50-64 SEQ ID NO: 1.

53. Способ по любому из вариантов реализации 47-52, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 37-53 и 59-77 SEQ ID NO: 1.

54. Способ по любому из вариантов реализации 47-53, в котором эпитоп представляет собой акти-

вирующей эпитоп $\gamma\delta$ Т-клетки.

55. Способ по варианту реализации 54, в котором связывание активирующего эпитопа: (i) подавляет $\gamma\delta$ TCR; (ii) активирует дегрануляцию $\gamma\delta$ Т-клетки; и/или (iii) активирует уничтожение $\gamma\delta$ Т-клеток.

56. Способ по любому из вариантов реализации 47-55, в котором антитело или его фрагмент связывается только с эпитопом в V-области V δ 1 цепи $\gamma\delta$ TCR.

57. Способ по любому из вариантов реализации 47-56, в котором антитело или его фрагмент не связываются с эпитопом, обнаруженным в CDR3 цепи V δ 1 $\gamma\delta$ TCR.

58. Способ по варианту реализации 57, в котором антитело или его фрагмент не связывается с эпитопом в аминокислотной области 91-105 (CDR3) SEQ ID NO: 1.

59. Способ по любому из вариантов реализации 1-58, в котором антитело или его фрагмент связывают переменную цепь дельта 1 (V δ 1) $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора (TCR) с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса менее чем $1,5 \times 10^{-7}$ М.

60. Способ по варианту реализации 59, в котором антитело или его фрагмент демонстрируют KD менее чем $1,3 \times 10^{-7}$ М или менее чем, например, $1,0 \times 10^{-7}$ М, в частности менее чем $5,0 \times 10^{-8}$ М.

61. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело или его фрагмент имеют значение EC50 для подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании, которое составляет менее чем 0,5 мкг/мл.

62. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело или его фрагмент имеют значение EC50 для подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании, которое составляет менее чем 0,06 мкг/мл.

63. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело или его фрагмент имеет значение EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,05 мкг/мл.

64. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело или его фрагмент имеет значение EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,005 мкг/мл, например, менее чем 0,002 мкг/мл.

65. Способ по варианту реализации 63 или по варианту реализации 64, в котором значение EC50 дегрануляции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов измеряется путем обнаружения экспрессии CD107a.

66. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело или его фрагмент имеет значение EC50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,5 мкг/мл.

67. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело или его фрагмент имеет значение EC50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,055 мкг/мл, например, менее чем 0,020 мкг/мл.

68. Способ по любому из вариантов реализации 61-67, в котором значение EC50 измеряют с использованием проточной цитометрии.

69. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 1-68, представляет собой scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, переменный домен (например, VH или VL), диатело, мини-тело или полноразмерное антитело.

70. Способ по варианту реализации 69, в котором антитело или его фрагмент представляет собой scFv или полноразмерное антитело, такое как IgG1.

71. Способ по варианту реализации 70, в котором антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 111-122.

72. Способ по варианту реализации 70 или варианту реализации 71, в котором антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 111-122.

73. Способ по варианту реализации 71 или по варианту реализации 72, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 111.

74. Способ по варианту реализации 71 или по варианту реализации 72, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 112.

75. Способ по варианту реализации 71 или по варианту реализации 72, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 116.

76. Способ по варианту реализации 71 или по варианту реализации 72, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 117.

77. Способ по варианту реализации 71 или по варианту реализации 72, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 118.

78. Способ по варианту реализации 71 или по варианту реализации 72, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 119.

79. Способ по варианту реализации 71 или по варианту реализации 72, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 120.

80. Способ по любому из вариантов реализации 1 или вариантов реализации 79, в котором антитело или его фрагмент являются человеческими.

81. Способ по варианту реализации 1, в котором антитело к v δ 1 или его фрагмент имеют значение EC50 для подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании, которое составляет менее чем 0,5 мкг/мл; значение EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,05 мкг/мл; и/или значение

ЕС50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,5 мкг/мл.

82. Способ модуляции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий стадию введения субъекту антитела к $\nu\delta 1$ или его фрагмента, как определено в любом из вариантов реализации 1-81.

83. Способ по варианту реализации 82, в котором субъект страдает онкологическим заболеванием, инфекционным заболеванием или воспалительным заболеванием.

84. Способ по варианту реализации 82, в котором модуляция иммунного ответа у субъекта включает по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из активации $\gamma\delta$ Т-клеток, вызова или увеличения пролиферации $\gamma\delta$ Т-клеток, вызова или увеличения размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, вызова или увеличения дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток, вызова или увеличения активности уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток, вызова или увеличения цитотоксичности $\gamma\delta$ Т, вызова или увеличения мобилизации $\gamma\delta$ Т-клеток, увеличения выживаемости $\gamma\delta$ Т-клеток и повышения устойчивости к истощению $\gamma\delta$ Т-клеток.

85. Способ по любому из вариантов реализации 1-84, в котором больные клетки уничтожают, а здоровые клетки сохраняют.

86. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, которое связывается по меньшей мере с двумя антигенами-мишенями, причем первым по меньшей мере из двух антигенов-мишеней является $\nu\delta 1$, и которое включает один или более из следующих элементов:

CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: A1-A12 (из табл. 2); и/или

CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38-61.

87. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 86, которое включает область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 2-13, например, SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11.

88. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 86 или варианте реализации 87, которое включает область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26-37, например, SEQ ID NO: 32, 33, 34 или 35.

89. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-88, которое включает область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38-49, например, SEQ ID NO: 44, 45, 46 или 47.

90. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-89, которое включает область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 44.

91. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-89, которое включает область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 45.

92. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-89, которое включает область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 34, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 46.

93. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-89, которое включает область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 35, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 47.

94. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-93, которое включает область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 14-25, например, SEQ ID NO: 20, 21, 22 или 23.

95. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-94, которое включает область VL, содержащую CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12, например, SEQ ID NO: A7, A8, A9 или A10.

96. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-95, которое включает область VL, содержащую CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 50-61, на-

116. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 105-109, которое содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

117. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 105-116, при этом области VH и VL соединены линкером, таким как полипептидный линкер.

118. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 117, при этом линкер имеет формат $(Gly_4Ser)_n$, где $n = 1-8$.

119. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 117 или варианте реализации 118, при этом линкер включает линкер $[(Gly_4Ser)_n(Gly_3AlaSer)_m]_p$, где n, m и $p = 1-8$.

120. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 117-118, при этом линкер содержит SEQ ID NO: 98.

121. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 120, при этом линкер состоит из SEQ ID NO: 98.

122. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 86-97.

123. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 122, который содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 86-97.

124. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 94 или варианте реализации 122, который включает SEQ ID NO: 86.

125. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 94 или варианте реализации 122, который включает SEQ ID NO: 87.

126. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 94 или варианте реализации 122, который включает SEQ ID NO: 88.

127. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 94 или варианте реализации 122, который включает SEQ ID NO: 92.

128. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 94 или варианте реализации 122, который включает SEQ ID NO: 93.

129. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 94 или варианте реализации 122, который включает SEQ ID NO: 94.

130. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 94 или варианте реализации 122, который включает SEQ ID NO: 95.

131. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, которое связывается с таким же или по существу с тем же эпитопом V δ 1, что и антитело или его фрагмент, или конкурирует с ним, как определено в любом из вариантов реализации 86-130.

132. Выделенное антитело к TCR с варибельной цепью дельта 1, мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, которое связывается по меньшей мере с двумя антигенами-мишенями, в котором первый по меньшей мере из двух антигенов-мишеней представляет собой V δ 1, и при этом мультиспецифическое антитело или его фрагмент, который связывается с эпитопом V δ 1, содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислот 1-90 SEQ ID NO: 1.

133. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в варианте реализации 132, в котором эпитоп содержит по меньшей мере один из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 1.

134. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в варианте реализации 132 или варианте реализации 133, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

135. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в варианте реализации 134, в котором эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

136. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 132-135, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 5-20 и 62-77 SEQ ID NO: 1.

137. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 132-135, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотной области 50-64 SEQ ID NO: 1.

138. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 132-135, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 37-53 и 59-77 SEQ ID NO: 1.

139. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 132-138, в котором эпитоп представляет собой активирующий эпитоп $\gamma\delta$ Т-клетки.

140. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в варианте реализации 139, в котором связывание активирующего эпитопа: (i) подавляет $\gamma\delta$ TCR; (ii) активирует дегрануляцию $\gamma\delta$ Т-клетки; и/или (iii) активирует уничтожение $\gamma\delta$ Т-клеток.

141. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 132-140, которое связывается только с эпитопом в V-области V δ 1 цепи $\gamma\delta$ TCR.

142. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 132-141, которое не связывается с эпитопом, обнаруженным в CDR3 цепи V δ 1 $\gamma\delta$ TCR.

143. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в варианте реализации 142, которое не связывается с эпитопом в аминокислотной области 91-105 (CDR3) SEQ ID NO: 1.

144. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-143, которое связывает вариабельную цепь дельта 1 (V δ 1) $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора (TCR) с аффинностью связывания (KD), как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса менее чем $1,5 \times 10^{-7}$ М.

145. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 144, в котором KD составляет менее чем $1,3 \times 10^{-7}$ М или менее чем, например, $1,0 \times 10^{-7}$ М, в частности менее чем $5,0 \times 10^{-8}$ М.

146. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент со значением EC50 для подавления регуляции $\gamma\delta$ TCR при связывании, которое составляет менее чем 0,5 мкг/мл.

147. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент со значением EC50 для подавления регуляции $\gamma\delta$ TCR при связывании, которое составляет менее чем 0,06 мкг/мл.

148. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент со значением EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,05 мкг/мл.

149. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент со значением EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,005 мкг/мл, например, менее чем 0,002 мкг/мл.

150. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 148 или варианте реализации 149, в котором значение EC50 дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток измеряется путем обнаружения экспрессии CD107a.

151. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент со значением EC50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,5 мкг/мл.

152. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент со значением EC50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,055 мкг/мл, например, менее чем 0,020 мкг/мл.

153. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 146-152, в котором значение EC50 измеряется с помощью проточной цитометрии.

154. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-153, которое представляет собой scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, вариабельный домен (например, VH или VL), диатело, мини-тело или полноразмерное антитело.

155. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 154, которое представляет собой scFv или полноразмерное антитело, такое как IgG1.

156. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 155, которое содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 111-122.

157. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 155 или варианте реализации 156, которое содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 111-122.

158. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 155 или варианте реализации 156, которое содержит SEQ ID NO: 111.

159. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 155 или варианте реализации 156, которое содержит SEQ ID NO: 112.

160. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 155 или варианте реализации 156, которое содержит SEQ ID NO: 116.

161. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 155 или варианте реализации 156, которое содержит SEQ ID NO: 117.

162. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 155 или варианте реализации 156, которое содержит SEQ ID NO: 118.

163. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 155 или варианте реализации 156, которое содержит SEQ ID NO: 119.

164. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 155 или варианте реализации 156, которое содержит SEQ ID NO: 120.

165. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-164, которое является человеческим.

166. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-165, в котором второй по меньшей мере из двух антигенов-мишеней выбран из группы, состоящей из CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32A, CD32B, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79A, CD79B, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85B, CD85C, CD85D, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD85M, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140A, CD140B, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158, CD158A, CD158B1, CD158B2, CD158C, CD158D, CD158E1, CD158E2, CD158F1, CD158F2, CD158G, CD158H, CD158I, CD158J, CD158K, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD167b, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD187, CD188, CD189, CD190, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210a, CDw210b, CD211, CD212, CD213a1, CD213a2, CD214, CD215, CD216, CD217, CD218a, CD218b, CD219, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD237, CD238, CD239, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245[17], CD246, CD247, CD248, CD249, CD250, CD251, CD252, CD253, CD254, CD255, CD256, CD257, CD258, CD259, CD260, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD285, CD286, CD287, CD288, CD289, CD290, CD291, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300A, CD300C, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD308, CD309, CD310, CD311, CD312, CD313, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD323, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD330, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370 и CD371.

167. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-165, в котором второй по меньшей мере из двух целевых антигенов выбран из группы, состоящей из AFP, АКАР-4, ALK, альфафетопротейна, рецептора андрогенов, В7Н3, BAGE, ВСА225, ВСАА, Vcr-abl, бета-катенина, бета-ХГЧ, бета-хорионического гонадотропина человека, BORIS, ВТАА, СА 125, СА 15-3, СА 195, СА 19-9, СА 242, СА 27.29, СА 72-4, СА-50, САМ 17.1, САМ43, карбоангидразы IX, карциноэмбрионального антигена, CD22, CD33/IL3Ra, CD68VP1, CDK4, СЕА, хондроитинсульфат протеогликана 4 (CSPG4), с- Met, СО-029, CSPG4, циклина В1, белка, связанного с циклофилином С, СYP1B1, E2A-PRL, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, эфрина В2, антигенов вируса Эпштейна-Барра EBVA, ERG (ген слияния TMPR-SS2ETS), ETV6-AML, FAP, FGF-5, Fосродственного антигена 1, фукозил GM1, G250, Ga733EpCAM, GAGE-1, GAGE-2, GD2, GD3, ассоциированный с глиомой антигена, GloboH, гликолипида F77, GM3, GP 100, GP 100 (Pmel 17), H4-RET, HER-2/neu, HER-2/Neu/ErbB-2, высокомолекулярного антигена, связанного с меланомой (HMW-MAA), HPV E6, HPV E7, hTERT, HTgp-175, обратной транскриптазы теломеразы человека, идиотипа, рецептора IGF-I, IGF-II, IGH-IGK, инсулинового фактора роста (IGF)-I, карбоксилэстеразы кишечника, K-ras, LAGE-1a, LCK, лектин-реактивного AFP, легумина, LMP2, M344, MA-50, связывающего Mac-2 белка, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, MART-1, MART-1/MelanA, M-CSF, связанного с меланомой хондроитинсульфат протеогликана (MCSP), мезотелин, MG7-Ag, ML-IAP, MN-CA IX, MOV18, MUC1, Mum-1, hsp70-2, MYCN, MYL-RAR, NA17, NB/70K, нейрон-глиального антигена 2 (NG2), эластазы нейтрофилов, nm-23H1, NuMa, NY-BR-1, NY-CO-1, NY-

ESO, NY-ESO-1, OY-TES1, p15, p16, p180erbB3, p185erbB2, p53, мутанта p53, Page4, PAX3, PAX5, PDGFR-бета, PLAC1, полисиаловой кислоты, опухолевого антигена-1 карциномы простаты (PCTA-1), простатоспецифического антигена, кислой фосфатазы простаты (PAP), протеиназы 3 (PR1), PSA, PSCA, PSMA, RAGE-1, Ras, Ras-мутант, R CAS1, RGS5, RhoC, ROR1, RU1, RU2 (AS), SART3, SDCCAG16, sLe(a), белка спермы 17, SXX2, STn, сурвивина, TA-90, TAAL6, TAG-72, теломеразы, тиреоглобулина, Tie 2, TIGIT, TLP, Tn, TPS, TRP-1, TRP-2, TRP-2, TSP-180, тирозиназы, VEGFR2, VISTA, WT1, XAGE 1, 43-9F, 5T4 и 791Tgp72.

168. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-165, в котором формат мультиспецифического антитела выбран из групп, состоящих из CrossMab, DAF (два-в-одном), DAF (четыре-в-одном), DutaMab, DT-IgG, ручки в отверстиях (КИШ), ручки в отверстиях (общая легкая цепь), зарядной пары, замены Fab-области, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y, Fcab, κλ-тела, ортогонального Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, DVI-IgG (четыре-в-одном), нанотела, нанотела-HAS, BiTE, диатела, DART, TandAb, sc-Диатела, sc-Диатела-CH3, Диатела-CH3, тройного тела, миниантитела, минитела, TriBi минитела, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab)2, F(ab)2-scFv2, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, четырехвалентного HCAb, sc-Диатела-Fc, Диатела-Fc, tandemного scFv-Fc, интратела, Dock и Lock, ImmTAC, HSA-тела, sc-Диатела-HAS, tandemного scFv-токсина, IgG-IgG, ov-X-тела, диатела, mab2 и scFv1-PEG-scFv2.

169. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-168.

170. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая мультиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащая последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности SEQ ID NO: 99-110.

171. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая мультиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащая последовательность SEQ ID NO: 99-110.

172. Вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащий полинуклеотидную последовательность, как определено в любом из вариантов реализации 169-171.

173. Вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащий область VH SEQ ID NO: 99-110.

174. Вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащий область VL SEQ ID NO: 99-110.

175. Вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащий область VH варианта реализации 173 и область VL варианта реализации 174.

176. Клетка, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 169-171, или вектор экспрессии, как определено в любом из вариантов реализации 172-175.

177. Клетка, содержащая первый вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 173, и второй вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 174.

178. Клетка, содержащая вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 175.

179. Клетка по любому из вариантов реализации 176-178, в которой полинуклеотид или вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, кодирует мембранный якорь или трансмембранный домен, слитый с антителом или его фрагментом, при этом антитело или его фрагмент представлено на внеклеточной поверхности клетки.

180. Композиция, содержащая мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-168.

181. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-168, вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем.

182. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 86-168, или фармацевтическая композиция, как определено в варианте реализации 125, для применения в качестве лекарственного средства.

183. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, или фармацевтическая композиция, как определено в варианте реализации 182, для применения при лечении онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

184. Способ лечения онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного мультиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в любом из вариантов реализации 86-168 или фармацевтическая композиция, как определено в варианте реализации 125.

184. Выделенный антиген, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 123 для применения при получении мультиспе-

цифического антитела или его фрагмента.

185. Способ получения мультиспецифического антитела или его фрагмента, включающий:

(i) конструирование серии антигенов, содержащей аминокислотную последовательность вариабельной цепи дельта 1 TCR (TRDV1), при этом последовательность CDR3 TRDV1 является одинаковой для всех антигенов в серии;

(ii) приведение в контакт первого антигена, сконструированного на стадии (i), с библиотекой антител;

(iii) выделение антител или их фрагментов, которые связываются с антигеном;

(iv) приведение в контакт выделенных антител или их фрагментов со вторым антигеном, сконструированным на стадии (i); и

(v) выделение антител или их фрагментов, которые связываются как с первым, так и со вторым антигеном.

186. Способ, как определено в варианте реализации 185, который дополнительно включает воздействие на выделенные антитела или их фрагменты второй серии антигенов, содержащих $\gamma\delta$ TCR с другой вариабельной цепью дельта, такой как вариабельная цепь дельта 2 TCR (TRDV2) или вариабельная цепь дельта 3 TCR (TRDV3), а затем отрицательную селекцию антител или их фрагментов, которые также связываются со второй серией антигенов.

187. Способ по варианту реализации 185 или по варианту реализации 186, в котором первая и/или вторая серии антигенов представлены в виде лейциновой молнии и/или слияния Fc.

188. Способ по любому из вариантов реализации 185-187, в котором ряд антигенов находится в гетеродимерном и/или гомодимерном формате.

189. Антитело, полученное способом, определенным в любом из вариантов реализации 185-188.

190. Антитело к $v\delta 1$ или его фрагмент для применения в способе лечения онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

191. Антитело к $v\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент включает одно или более из:

CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: A1-A12 (из табл. 2); и/или

CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38-61.

192. Антитело к $v\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 2-13, например, SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11.

193. Антитело к $v\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26-37, например, SEQ ID NO: 32, 33, 34 или 35.

194. Антитело к $v\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38-49, например, SEQ ID NO: 44, 45, 46 или 47.

195. Антитело к $v\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 44.

196. Антитело к $v\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 45.

197. Антитело к $v\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 34, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 46.

198. Антитело к $v\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 35, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 47.

199. Антитело к $v\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 14-25, например, SEQ ID NO: 20, 21,

его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

218. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

219. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81.

220. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

221. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

222. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит область VH и область VL, при этом области VH и VL соединены линкером, таким как полипептидный линкер.

223. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 222, в котором линкер имеет формат $(Gly_4Ser)_n$, где $n = 1-8$.

224. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 222 или по варианту реализации 223, в котором линкер включает линкер $[(Gly_4Ser)_n(Gly_3AlaSer)_m]_p$, где n , m и $p = 1-8$.

225. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 222 или по варианту реализации 224, в котором линкер содержит SEQ ID NO: 98.

226. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 86-97.

227. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 86-97.

228. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент включает SEQ ID NO: 86.

229. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент включает SEQ ID NO: 87.

230. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент включает SEQ ID NO: 88.

231. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент включает SEQ ID NO: 92.

232. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент включает SEQ ID NO: 93.

233. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент включает SEQ ID NO: 94.

234. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент включает SEQ ID NO: 95.

235. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент связывается с тем же или по существу с тем же эпитопом, что и антитело или его фрагмент, или конкурирует с ним, как определено в любом из вариантов реализации 190-234.

236. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $V\delta 1$ или его фрагмент включает связывание с эпитопом варибельной цепи дельта 1 ($V\delta 1$) рецептора $\gamma\delta$ Т-клеток (TCR), содержащей один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислот 1-90 SEQ ID NO: 1.

237. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации по варианту реализации 236, в котором эпитоп содержит по меньшей мере один из аминокислотных остатков 3,5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 1.

238. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по вариантам реализации 236 или 237, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

239. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по любому из вариантов реализации 236-238, в котором эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

240. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по любому из вариантов реализации 236-239, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 5-20 и 62-77 SEQ ID NO: 1.

241. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по любому из вариантов реализации 236-240, в котором эпи-

топ содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотной области 50-64 SEQ ID NO: 1.

242. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по любому из вариантов реализации 236-241, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 37-53 и 59-77 SEQ ID NO: 1.

243. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по любому из вариантов реализации 236-242, в котором эпитоп представляет собой активирующий эпитоп $\gamma\delta$ Т-клетки.

244. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 243, в котором связывание активирующего эпитопа: (i) подавляет $\gamma\delta$ TCR; (ii) активирует дегрануляцию $\gamma\delta$ Т-клетки; и/или (iii) активирует уничтожение $\gamma\delta$ Т-клеток.

245. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по любому из вариантов реализации 236-244, в котором антитело или его фрагмент связывается только с эпитопом в V-области V $\delta 1$ цепи $\gamma\delta$ TCR.

246. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по любому из вариантов реализации 236-245, в котором антитело или его фрагмент не связывается с эпитопом, обнаруженным в CDR3 цепи V $\delta 1$ $\gamma\delta$ TCR.

247. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 246, в котором антитело или его фрагмент не связывается с эпитопом в аминокислотной области 91-105 (CDR3) SEQ ID NO: 1.

248. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по любому из вариантов реализации 190-247, в котором антитело или его фрагмент связывают переменную цепь дельта 1 (V $\delta 1$) $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора (TCR) с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса менее чем $1,5 \times 10^{-7}$ М.

249. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 248, в котором антитело или его фрагмент демонстрируют KD менее чем $1,3 \times 10^{-7}$ М или менее чем, например, $1,0 \times 10^{-7}$ М, в частности менее чем $5,0 \times 10^{-8}$ М.

250. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело или его фрагмент имеют значение EC50 для подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании, которое составляет менее чем 0,5 мкг/мл.

251. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело или его фрагмент имеют значение EC50 для подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании, которое составляет менее чем 0,06 мкг/мл.

252. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело или его фрагмент имеет значение EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее 0,05 мкг/мл.

253. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело или его фрагмент имеет значение EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,005 мкг/мл, например, менее чем 0,002 мкг/мл.

254. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 252 или по варианту реализации 253, в котором значение EC50 дегрануляции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов измеряется путем обнаружения экспрессии CD 107a.

255. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело или его фрагмент имеет значение EC50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее 0,5 мкг/мл.

256. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело или его фрагмент имеет значение EC50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,055 мкг/мл, например, менее чем 0,020 мкг/мл.

257. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по любому из вариантов реализации 250-256, в котором значение EC50 измеряют с использованием проточной цитометрии.

258. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 190-257, представляет собой scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, переменный домен (например, VH или VL), диатело, мини-тело или полноразмерное антитело.

259. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 258, в котором указанное антитело или его фрагмент представляет собой scFv или полноразмерное антитело, такое как IgG1.

260. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 259, в котором антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 111-122.

261. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 259 или по варианту реализации 260, в котором антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 111-122.

262. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 260 или по варианту реализации 261, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 111.

263. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 260 или по варианту реализации 261, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 112.

264. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 260 или по варианту реализации 261, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 116.

265. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 260 или по варианту реализации 261, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 117.

266. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 260 или по варианту реализации 261, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 118.

267. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 260 или по варианту реализации 261, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 119.

268. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 260 или по варианту реализации 261, в котором антитело или его фрагмент содержит SEQ ID NO: 120.

269. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по любому из вариантов реализации 190-268, в котором указанное антитело или его фрагмент является человеческим.

270. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 190, в котором антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент имеют значение EC50 для подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании, которое составляет менее чем 0,5 мкг/мл; значение EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,05 мкг/мл; и/или значение EC50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,5 мкг/мл.

271. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по любому из вариантов реализации 190-270, для применения в способе модуляции иммунного ответа у субъекта.

272. Антитело к $\nu\delta 1$ или его фрагмент по варианту реализации 271, в котором субъект страдает онкологическим заболеванием, инфекционным заболеванием или воспалительным заболеванием.

273. Применение по варианту реализации 271, в котором модуляция иммунного ответа у субъекта включает по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из активации $\gamma\delta$ Т-клеток, вызова или увеличения пролиферации $\gamma\delta$ Т-клеток, вызова или увеличения размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, вызова или увеличения дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток, вызова или увеличения активности уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток, вызова или увеличения цитотоксичности $\gamma\delta$ Т, вызова или увеличения мобилизации $\gamma\delta$ Т-клеток, увеличения выживаемости $\gamma\delta$ Т-клеток и повышения устойчивости к истощению $\gamma\delta$ Т-клеток.

274. Применение по любому из вариантов реализации 190-273, в котором больные клетки уничтожаются, а здоровые клетки сохраняют.

275. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, которое связывается по меньшей мере с двумя антигенами-мишенями, причем первым по меньшей мере из двух антигенов-мишеней является $V\delta 1$, и которое включает один или более из следующих элементов:

CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: A1-A12 (из табл. 2); и/или

CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38-61.

276. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 275, которое включает область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 2-13, например, SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11.

277. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 275 или варианте реализации 276, которое включает область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 26-37, например, SEQ ID NO: 32, 33, 34 или 35.

278. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 275-277, которое включает область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 38-49, например, SEQ ID NO: 44, 45, 46 или 47.

279. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 275-278, которое включает область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 44.

280. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 275-278, которое включает область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 45.

риантов реализации 294-296, которое включает область VL, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 74-85.

298. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 297, при этом область VL содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 74, 75, 76, 80, 81, 82 или 83.

299. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из пунктов 294-298, которое включает область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74.

300. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из пунктов 294-298, которое включает область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

301. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из пунктов 294-298, которое включает область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

302. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из пунктов 294-298, которое включает область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

303. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из пунктов 294-298, которое включает область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81.

304. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из пунктов 294-298, которое включает область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

305. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из пунктов 294-298, которое включает область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

306. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 294-305, в котором области VH и VL соединены линкером, таким как полипептидный линкер.

307. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 306, в котором линкер имеет формат $(Gly_4Ser)_n$, где $n=1-8$.

308. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 306 или варианте реализации 307, в котором линкер включает линкер $[(Gly_4Ser)_n(Gly_3AlaSer)_m]_p$, где n, m и $p = 1-8$.

309. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 306-307, в котором линкер содержит SEQ ID NO: 98.

310. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 309, в котором линкер состоит из SEQ ID NO: 98.

311. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 86-97.

312. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 311, который содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 86-97.

313. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 283 или варианте реализации 311, который включает SEQ ID NO: 86.

314. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 283 или варианте реализации 311, который включает SEQ ID NO: 87.

315. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 283 или варианте реализации 311, который включает SEQ ID NO: 88.

316. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 283 или варианте реализации 311, который включает SEQ ID NO: 92.

317. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 283 или варианте реализации 311, который включает SEQ ID NO: 93.

318. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 283 или варианте реализации 311, который включает SEQ ID NO: 94.

319. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 283 или варианте реализации 311, который включает SEQ ID NO: 95.

320. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, которое связывается с таким же или по существу с тем же эпитопом V δ 1, что и антитело или его фрагмент, или конкурирует с ним, как определено в любом из вариантов реализации 275-319.

321. Выделенное антитело к TCR с вариабельной цепью дельта 1, мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, которое связывается по меньшей мере с двумя антигенами-мишенями, в ко-

тором первый по меньшей мере из двух антигенов-мишеней представляет собой V δ 1, и при этом мультиспецифическое антитело или его фрагмент, который связывается с эпитопом V δ 1, содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислот 1-90 SEQ ID NO: 1.

322. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в варианте реализации 321, в котором эпитоп содержит по меньшей мере один из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 1.

323. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в варианте реализации 321 или варианте реализации 322, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

324. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в варианте реализации 323, в котором эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

325. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 321-324, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 5-20 и 62-77 SEQ ID NO: 1.

326. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 321-324, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотной области 50-64 SEQ ID NO: 1.

327. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 321-324, в котором эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях 37-53 и 59-77 SEQ ID NO: 1.

328. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 321-327, в котором эпитоп представляет собой активирующий эпитоп $\gamma\delta$ Т-клетки.

329. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в варианте реализации 328, в котором связывание активирующего эпитопа: (i) подавляет $\gamma\delta$ TCR; (ii) активирует дегрануляцию $\gamma\delta$ Т-клетки; и/или (iii) активирует уничтожение $\gamma\delta$ Т-клеток.

330. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 321-329, которое связывается только с эпитопом в V-области V δ 1 цепи $\gamma\delta$ TCR.

331. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 321-330, которое не связывается с эпитопом, обнаруженным в CDR3 цепи V δ 1 $\gamma\delta$ TCR.

332. Выделенное мультиспецифическое антитело человека или его фрагмент, как определено в варианте реализации 331, которое не связывается с эпитопом в аминокислотной области 91-105 (CDR3) SEQ ID NO: 1.

333. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 275-332, которое связывает вариабельную цепь дельта 1 (V δ 1) $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора (TCR) с аффинностью связывания (KD), как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса менее чем $1,5 \times 10^{-7}$ М.

334. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 333, в котором KD составляет менее чем $1,3 \times 10^{-7}$ М или менее чем, например, $1,0 \times 10^{-7}$ М, в частности менее чем $5,0 \times 10^{-8}$ М.

335. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент со значением EC50 для подавления регуляции $\gamma\delta$ TCR при связывании, которое составляет менее чем 0,5 мкг/мл.

336. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент со значением EC50 для подавления регуляции $\gamma\delta$ TCR при связывании, которое составляет менее чем 0,06 мкг/мл.

337. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент со значением EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,05 мкг/мл.

338. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент со значением EC50 для дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,005 мкг/мл, например, менее чем 0,002 мкг/мл.

339. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 337 или варианте реализации 338, в котором значение EC50 дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток измеряется путем обнаружения экспрессии CD107a.

340. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент со значением EC50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,5 мкг/мл.

341. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент со значением EC50 для уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании, которое составляет менее чем 0,055 мкг/мл, например, менее чем 0,020 мкг/мл.

342. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 335-341, в котором значение EC50 измеряется с помощью проточной цитометрии.

343. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 275-342, которое представляет собой scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, вариабельный домен (например, VH или VL), диатело, мини-тело или полноразмерное антитело.

344. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 343, которое представляет собой scFv или полноразмерное антитело, такое как IgG1.

345. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 344, которое содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности любой из SEQ ID NO: 111-122.

346. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 344 или варианте реализации 345, которое содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 111-122.

347. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 344 или варианте реализации 345, которое содержит SEQ ID NO: 111.

348. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 344 или варианте реализации 345, которое содержит SEQ ID NO: 112.

349. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 344 или варианте реализации 345, которое содержит SEQ ID NO: 116.

350. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 344 или варианте реализации 345, которое содержит SEQ ID NO: 117.

351. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 344 или варианте реализации 345, которое содержит SEQ ID NO: 118.

352. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 344 или варианте реализации 345, которое содержит SEQ ID NO: 119.

353. Выделенное мультиспецифическое антитело, как определено в варианте реализации 344 или варианте реализации 345, которое содержит SEQ ID NO: 120.

354. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 275-353, которое является человеческим.

355. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 375-354, в котором второй по меньшей мере из двух антигенов-мишеней выбран из группы, состоящей из CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32A, CD32B, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79A, CD79B, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85B, CD85C, CD85D, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD85M, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140A, CD140B, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158, CD158A, CD158B1, CD158B2, CD158C, CD158D, CD158E1, CD158E2, CD158F1, CD158F2, CD158G, CD158H, CD158I, CD158J, CD158K, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD167b, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD187, CD188, CD189, CD190, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210a, CDw210b, CD211, CD212, CD213a1, CD213a2, CD214, CD215, CD216, CD217, CD218a, CD218b, CD219, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD237, CD238, CD239, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245[17], CD246, CD247, CD248, CD249, CD250, CD251, CD252, CD253, CD254, CD255, CD256, CD257, CD258, CD259, CD260, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD285, CD286, CD287, CD288, CD289, CD290, CD291, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300A, CD300C, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD308, CD309, CD310, CD311, CD312, CD313, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321,

CD322, CD323, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD330, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370 и CD371.

356. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 375-354, в котором второй по меньшей мере из двух целевых антигенов выбран из группы, состоящей из AFP, АКАР-4, АЛК, альфафетопротеина, рецептора андрогенов, В7Н3, BAGE, ВСА225, ВСАА, Vcr-abl, бета-катенина, бета-ХГЧ, бета-хорионического гонадотропина человека, BORIS, ВТАА, СА 125, СА 15-3, СА 195, СА 19-9, СА 242, СА 27.29, СА 72-4, СА-50, САМ 17.1, САМ43, карбоангидраза IX, карциноэмбрионального антигена, CD22, CD33/IL3Ra, CD68\p1, CDK4, СЕА, хондроитинсульфат протеогликана 4 (CSPG4), с-Met, CO-029, CSPG4, циклина В1, белка, связанного с циклофилином С, СYP1B1, E2A-PRL, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, эфрина В2, антигена вируса Эпштейна-Барра EBVA, ERG (ген слияния TMPR-SS2ETS), ETV6-AML, FAP, FGF-5, Fosродственного антигена 1, фукозил GM1, G250, Ga733\EpCAM, GAGE-1, GAGE-2, GD2, GD3, ассоциированный с глиомой антигена, GloboH, гликолипида F77, GM3, GP 100, GP 100 (Pmel 17), H4-RET, HER-2/neu, HER-2/Neu/ErbB-2, высокомолекулярного антигена, связанного с меланомой (HMW-MAA), HPV E6, HPV E7, hTERT, HTgp-175, обратной транскриптазы теломеразы человека, идиотипа, рецептора IGF-I, IGF-II, IGH-IGK, инсулинового фактора роста (IGF)-I, карбоксилэстеразы кишечника, K-ras, LAGE-1a, LCK, лектин-реактивного AFP, легумина, LMP2, M344, MA-50, связывающего Mac-2 белка, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, MART-1, MART-1/MelanA, M-CSF, связанного с меланомой хондроитинсульфат протеогликана (MCSP), мезотелин, MG7-Ag, ML-IAP, MN-CA IX, MOV18, MUC1, Mum-1, hsp70-2, MYCN, MYL-RAR, NA17, NB/70K, нейрон-глиального антигена 2 (NG2), эластазы нейтрофилов, nm-23H1, NuMa, NY-BR-1, NY-CO-1, NY-ESO, NY-ESO-1, NY-ESO-1, OY-TES1, p15, p16, p180erbB3, p185erbB2, p53, мутанта p53, Page4, PAX3, PAX5, PDGFR-бета, PLAC1, полисиаловой кислоты, опухолевого антигена-1 карциномы простаты (PCTA-1), простатоспецифического антигена, кислой фосфатазы простаты (PAP), протеиназы 3 (PR1), PSA, PSCA, PSMA, RAGE-1, Ras, Ras-мутант, R CAS1, RGS5, RhoC, ROR1, RU1, RU2 (AS), SART3, SDCCAG16, sLe(a), белка спермы 17, SXX2, STn, сурвивина, TA-90, TAAL6, TAG-72, теломеразы, тиреоглобулина, Tie 2, TIGIT, TLP, Tn, TPS, TRP-1, TRP-2, TRP-2, TSP-180, тирозиназы, VEGFR2, VISTA, WT1, XAGE 1, 43-9F, 5T4 и 791Tgp72.

357. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 375-354, в котором формат мультиспецифического антитела выбран из групп, состоящих из CrossMab, DAF (два-в-одном), DAF (четыре-в-одном), DutaMab, DT-IgG, ручки в отверстиях (КИН), ручки в отверстиях (общая легкая цепь), зарядной пары, замены Fab-области, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y, Fcab, κλ-тела, ортогонального Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, КИН IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, DVI-IgG (четыре-в-одном), нанотела, нанотела-HAS, BiTE, диатела, DART, TandAb, sc-Диатела, sc-Диатела-CH3, Диатела-CH3, тройного тела, миниантитела, минитела, TriBi минитела, scFv-CH3 КИН, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab)2, F(ab)2-scFv2, scFv-КИН, Fab-scFv-Fc, четырехвалентного HCAb, sc-Диатела-Fc, Диатела-Fc, tandemного scFv-Fc, интратела, Dock и Lock, ImmTAC, HSA-тела, sc-Диатела-HAS, tandemного scFv-токсина, IgG-IgG, ov-X-тела, диатела, mab2 и scFv1-PEG-scFv2.

358. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 375-357.

359. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая мультиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащая последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности SEQ ID NO: 99-110.

360. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая мультиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащая последовательность SEQ ID NO: 99-110.

361. Вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащий полинуклеотидную последовательность, как определено в любом из вариантов реализации 358-361.

362. Вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащий область VH SEQ ID NO: 99-110.

363. Вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащий область VL SEQ ID NO: 99-110.

364. Вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащий область VH варианта реализации 117 и область VL варианта реализации 307.

365. Клетка, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 358-360, или вектор экспрессии, как определено в любом из вариантов реализации 361-364.

366. Клетка, содержащая первый вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 362, и второй вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 363.

367. Клетка, содержащая вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в варианте реализации 364.

368. Клетка по любому из вариантов реализации 365-367, в которой полинуклеотид или вектор экспрессии, кодирующий мультиспецифическое антитело или его фрагмент, кодирует мембранный якорь или трансмембранный домен, слитый с антителом или его фрагментом, при этом антитело или его фрагмент представлено на внеклеточной поверхности клетки.

369. Композиция, содержащая мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 275-357.

370. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 275-357, вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем.

371. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 275-357, или фармацевтическая композиция, как определено в варианте реализации 314, для применения в качестве лекарственного средства.

372. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, или фармацевтическая композиция, как определено в варианте реализации 371, для применения при лечении онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

373. Выделенное мультиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов реализации 275-357, или фармацевтическая композиция, как определено в варианте реализации 314, для применения при лечении онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

374. Выделенный антиген, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 123 для применения при получении мультиспецифического антитела или его фрагмента.

375. Способ получения мультиспецифического антитела или его фрагмента, включающий:

(i) конструирование серии антигенов, содержащей аминокислотную последовательность вариационной цепи дельта 1 TCR (TRDV1), при этом последовательность CDR3 TRDV1 является одинаковой для всех антигенов в серии;

(ii) приведение в контакт первого антигена, сконструированного на стадии (i), с библиотекой антител;

(iii) выделение антител или их фрагментов, которые связываются с антигеном;

(iv) приведение в контакт выделенных антител или их фрагментов со вторым антигеном, сконструированным на стадии (i); и

(v) выделение антител или их фрагментов, которые связываются как с первым, так и со вторым антигеном.

376. Способ, как определено в варианте реализации 375, который дополнительно включает воздействие на выделенные антитела или их фрагменты второй серии антигенов, содержащих $\gamma\delta$ TCR с другой вариационной цепью дельта, такой как вариационная цепь дельта 2 TCR (TRDV2) или вариационная цепь дельта 3 TCR (TRDV3), а затем отрицательную селекцию антител или их фрагментов, которые также связываются со второй серией антигенов.

377. Способ по варианту реализации 375 или по варианту реализации 376, в котором первая и/или вторая серии антигенов представлены в виде лейциновой молнии и/или слияния Fc.

378. Способ по любому из вариантов реализации 375-377, в котором ряд антигенов находится в гетеродимерном и/или гомодимерном формате.

379. Антитело, полученное способом, определенным в любом из вариантов реализации 375-378.

Другие особенности и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из приведенного в данном документе описания. Однако следует понимать, что описание и конкретные примеры с указанием предпочтительных вариантов реализации изобретения даны только для иллюстрации, так как различные изменения и модификации станут очевидными для специалистов в данной области техники. Далее изобретение будет описано с использованием следующих неограничивающих примеров.

Примеры

Пример 1. Материалы и способы.

Обнаружение антител человека.

Фаговый дисплей человека использовали для получения антител человека к вариационному домену V δ 1+ человека, как описано в данном документе. Библиотека была сконструирована, как описано в Schofield et al (Genome biology 2007, 8(11): R254) и содержала вариационный одноцепочечный фрагмент (scFv), отображающий библиотеку из ~40 миллиардов клонов человека. Эта библиотека была подвергнута скринингу с использованием антигенов, способов, отбора, отрицательного отбора, скрининга и характеристики, как описано в данном документе.

Получение антигена.

Получение растворимых гетеродимеров $\gamma\delta$ TCR, содержащих константные области TCR α и TCR β , используемых в приведенных ниже Примерах, была выполнено соответствии с Xu et al. (2011) PNAS 108:

2414-2419. Домены V γ или V δ были слиты в рамке считывания с константной областью TCR α или TCR β , лишенной трансмембранного домена, за которой следовала последовательность лейциновой застежки или последовательность Fc и гистидиновый тег/линкер.

Экспрессионную конструкцию временно трансфицировали в суспензионные клетки EXP1 HEK293 млекопитающих (либо в виде одиночной трансфекции, либо для совместной трансфекции гетеродимера). Секретированные рекомбинантные белки выделяли и очищали из культурального супернатанта с помощью аффинной хроматографии. Чтобы гарантировать хорошее извлечение мономерного антигена, образцы дополнительно очищали с использованием препаративной эксклюзионной хроматографии (SEC). Очищенные антигены анализировали на чистоту с помощью SDS-PAGE и состояние агрегации с помощью аналитической SEC.

Функциональная проверка антигена.

Специфичность антигенов, содержащих варибельную цепь дельта 1 (V δ 1), была подтверждена в иммуноанализе DELFIA (Perkin Elmer) и в анализе на основе потока в конкуренции с $\gamma\delta$ Т-клетками с использованием антитела REA173-Miltenyi Biotec к V δ 1.

Иммуноферментный анализ флуоресценции лантаноидов с усиленной диссоциацией (DELFLIA) Для подтверждения специфичности антигена иммуноанализ DELFLIA проводили с антигеном, непосредственно нанесенным на планшет (3 мкг/мл антигена в 50 мкл ФСБ при 4°C в течение ночи (Nunc # 437111) и серийным разведением первичных антител, начиная с 300 нМ. Для обнаружения DELFLIA в качестве вторичных антител использовали Eu-N1 анти-человеческий IgG (Perkin Elmer # 1244-330) при разведении 1/500 в 50 мкл 3% MPBS (ФСБ+ 3% (мас./об.) сухого обезжиренного молока). Проявление осуществляли с помощью 50 мкл раствора усиления DELFLIA (Perkin Elmer # 4001-0010).

Ранжирование аффинности представляющих интерес антител выполняли с использованием иммуноанализа DELFLIA, в котором антитела захватывали с помощью белка G, нанесенного на планшет, и добавляли растворимый биотинилированный антиген L1 (DV1-GV4) в концентрации 5 нМ в 50 мкл (3MPBS). Для обнаружения использовали 50 мкл стрептавидин-Eu (1: 500 в буфере для анализа, Perkin Elmer) и проявили сигнал с помощью раствора для усиления DELFLIA. D1.3 hIgG1 (описано в England et al. (1999) J. Immunol. 162: 2129-2136) использовали в качестве отрицательного контроля.

Результаты отбора фагового дисплея субклонировали в вектор экспрессии scFv pSANG10 (Martin et al. (2006) BMC Biotechnol. 6: 46). Растворимый scFv экспрессировали и проверяли на связывание в DELFLIA с непосредственно иммобилизованными мишенями. Хиты определялись как сигнал DELFLIA выше 3000 единиц флуоресценции.

Получение антител.

Отобранные scFv субклонировали в каркасные области IgG1 с использованием коммерчески доступных плазмид. Клетки суспензии exp1293F трансфицировали указанными плазмидами для экспрессии антител. Для удобства, если не указано иное, антитела, охарактеризованные в этих примерах, относятся к антителам в формате IgG1, отобранным из фагового дисплея, как scFv. Однако антитела по изобретению могут быть в любом формате антител, как обсуждалось ранее.

Очистка антител.

Антитела IgG очищали от супернатантов с помощью хроматографии на протеине А. Концентрированные элюаты протеина А затем очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). Качество очищенного IgG анализировали с помощью ИФА, SDS-PAGE и SEC-ВЭЖХ.

Получение $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов.

Популяции обогащенных $\gamma\delta$ Т-клеток получали в соответствии со способами, описанными в WO 2016/198480 (т.е. $\gamma\delta$ Т-клетки крови) или WO2020/095059 (т.е. $\gamma\delta$ Т-клетки кожи). Вкратце, для полученных из крови $\gamma\delta$ Т-клеток, МКПК получали из крови и подвергали магнитному истощению $\alpha\beta$ Т-клеток. Затем истощенные по $\alpha\beta$ МКПК культивировали в среде CTS OpTmiser (ThermoFisher) в присутствии ОКТ-3 (или соответствующего антитела к V δ 1), IL-4, IFN- γ , IL-21 и IL-1 β в течение 7 дней. На 7 день культивирования в среду добавляли ОКТ-3 (или соответствующее антитело к V δ 1), IL-21 и IL-15 и инкубировали в течение следующих 4 дней. На 11 день культивирования в среду добавляли ОКТ-3 (или соответствующее антитело к V δ 1) и IL-15 и инкубировали в течение следующих 3 дней. На 14 день культивирования половину среды заменяли свежим полным OpTmiser и добавляли ОКТ-3 (или соответствующее антитело к V δ 1), IL-15 и IFN- γ . Начиная с 17 дня культивирования, в культуру добавляли ОКТ-3 (или соответствующее антитело к V δ 1) и IL-15 каждые 3-4 дня; половину среды заменяли на свежую каждые 7 дней.

Для полученных из кожи $\gamma\delta$ Т-клеток, образцы кожи готовили путем удаления подкожного жира и использовали 3-миллиметровый пробойник для биопсии, чтобы сделать несколько проколов. Пуансоны размещали на решетках из углеродной матрицы и помещали в лунку G-REX6 (Wilson Wolf). Каждую лунку заполняли полной средой для выделения, содержащей среду AIM-V (Gibco, Life Technologies), CTS замену иммунологической сыворотки (Life Technologies), IL-2 и IL-15. В течение первых 7 дней культивирования использовали полную среду для выделения, содержащую амфотерицин В (Life Technologies) ("AMP"). Среду меняли каждые 7 дней, осторожно отсасывая верхнюю среду и заменяя ее

полной средой выделения 2X (без АМФ), стараясь не беспокоить клетки на дне планшета или биореактора. По истечении трех недель культивирования полученные эрегированные клетки затем пассировали в свежие сосуды для культур тканей и свежую среду (например, среду AIM-V или среду TechMAX (Miltenyi)) плюс рекомбинантный IL-2, IL-4, IL-15 и IL-21 перед сбором. Необязательно, $\alpha\beta$ Т-клетки, также присутствующие в культуре, затем удаляли с помощью наборов для истощения $\alpha\beta$ Т-клеток и связанных протоколов, таких как протоколы, предоставленные Miltenyi. Для получения дополнительной ссылки см. WO 2020/095059.

Анализ связывания $\gamma\delta$ Т-клеток.

Связывание антител с $\gamma\delta$ Т-клетками тестировали, инкубируя фиксированную концентрацию очищенных антител с 250000 $\gamma\delta$ Т-клетками. Эту инкубацию проводили в условиях блокирования, чтобы предотвратить неспецифическое связывание антител через рецептор Fc. Обнаружение проводили путем добавления вторичного, конъюгированного с флуоресцентным красителем антитела к IgG1 человека. Для отрицательного контроля клетки получали с а) только изотипическим антителом (рекомбинантный IgG человека), б) только с флуоресцентным красителем, конъюгированным с антителом к IgG человека и с) комбинацией а) и б). Также готовили и анализировали контрольную лунку с полностью неокрашенными клетками. В качестве положительного контроля использовали очищенное мышинное моноклональное антитело IgG2 к CD3 человека и очищенное мышинное моноклональное антитело IgG1 к TCR V δ 1 человека в двух различных концентрациях и окрашивали конъюгированным с флуоресцентным красителем вторичным антителом козы к антителу мыши. Анализ считался приемлемым, если средняя интенсивность флуоресценции положительных контролей с более низкой концентрацией в канале FITC была по меньшей мере в десять раз выше, чем у наивысшего отрицательного контроля.

SPR анализ.

Прибор MASS-2 с аминовым чипом высокой емкости (оба от Sierra Sensors, Германия) использовали для выполнения анализа SPR. 15 нМ IgG были захвачены через белок G на аминовый чип высокой емкости (100 нМ для TS8.2). Антиген L1 (DV1-GV4) пропускали через клетку в серии разведений 1:2 от 2000 нМ до 15,625 нМ со следующими параметрами: Ассоциация 180 с, диссоциация 600 с, скорость потока 30 мкл/мин, рабочий буфер ФСБ+ 0,02% Tween 20. Все эксперименты проводили при комнатной температуре на приборе МАСС-2. Подгонку устойчивого состояния определяли в соответствии со связыванием Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения Sierra Analyzer 3.2.

Антитела сравнения.

Антитела по изобретению сравнивали с коммерчески доступными антителами в тестовых анализах, как описано.

Антитело	Источник	№ по каталогу
Очищенное Ultra-LEAF™ антитело к CD3 человека (ОКТ3), функциональное	Biolegend	317326
Очищенное Ultra-LEAF™ антитело к IgG2a человека (изотипический контроль для ОКТ3)	Biolegend	400264
Очищенное mAb TCR V δ 1 человека (функциональный TS8.2)	ThermoFisher	TCR1730
Очищенное Ultra-LEAF™ IgG1 мыши, изотип к Ctrl-антителу к TS8.2	Biolegend	400166
Анти-человеческое CD107a BV421 (клон H4A3)	BD Biosciences	562623
BV421 IgG1 мыши, к изотипный контрольный клон X40 (RUO)	BD Biosciences	562438

Анти-TCR человек (поток, прекращено)	Vδ1-PE-Vio770,	Miltenyi	130-100-540
Цетуксимаб		Получено на месте	-
D1.3 HEL (анти-куриный лизоцим; VH-VL мыши+ Fc IgG1 человека).		Получено на месте	-
Анти-RSV (он же Мотавизумаб)		Получено на месте	-

Анализ подавления и дегрануляции $\gamma\delta$ TCR.

Клетки-мишени THP-1 (TIB-202TM, ATCC), загруженные или не загруженные тестируемыми антигенами, были помечены CellTrackerTM Orange CMTMR (ThermoFisher, C2927) и инкубированы с $\gamma\delta$ Т-клетками в соотношении 2:1 в присутствии антитела CD107a (анти-человеческое CD107a BV421 (клон H4A3) BD Biosciences 562623). Через 2 ч инкубации поверхностную экспрессию $\gamma\delta$ TCR (для измерения подавления TCR) и экспрессию CD107a (для измерения дегрануляции) на $\gamma\delta$ Т-клетках оценивали с помощью проточной цитометрии.

Анализ уничтожения (например, для фиг. 6).

Активность уничтожения гамма-дельта Т-клеток и влияние тестируемых антител на активность уничтожения $\gamma\delta$ Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. После 4 ч совместного культивирования *in vitro* при соотношении $\gamma\delta$ Т-клеток и CellTrackerTM Orange CMTMR (ThermoFisher, C2927), меченных THP-1 (загруженных или не загруженных антителом) клеток 20:1, клетки окрашивали красителем Viability Dye eFluorTM 520 (ThermoFisher, 520 65-0867-14), чтобы различать живые и мертвые клетки-мишени TFLP-1. Во время сбора образцов клетки-мишени регистрировали по положительному результату CMTMR CellTrackerTM Orange и исследовали на гибель клеток на основании поглощения красителя жизнеспособности. CMTMR и eFluorTM 520 дважды положительные клетки распознавали как мертвые клетки-мишени. Уничтожающая активность $\gamma\delta$ Т-клеток выражалась в% от мертвых клеток-мишеней.

Картирование эпитопа.

Все образцы белка (антиген L1 (DV1-GV4) и антител 1245_P01_E07, 1245_P02_G04, 1252_P01_C08, 1251_P02_C05 и 1141_P01_E01), использованные для картирования эпитопа, анализировали на целостность белка и уровень агрегации с использованием MALDI для определения высоких масс.

Для определения эпитопа L1(DV1-GV4)/1245_P01_E07, L1(DV1-GV4)/1245_P02_G04, L1(DV1-GV4)/1252_P01_C08, L1(DV1-GV4)/1251_P02_C05 и L1(DV1-GV4)/1141_P01_E01 комплексов с высоким разрешением, белковые комплексы инкубировали с дейтерированными сшивающими агентами и подвергали мультиферментативному протеолизу с использованием трипсина, химотрипсина, Asp-N, эластазы и термолизина. После обогащения сшитыми пептидами образцы анализировали масс-спектрометрией высокого разрешения (n-ЖХ-LTQ-Orbitrap MS), а полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения XQuest и Stavroх.

Анализ уничтожения SYTOX в потоке.

Анализ SYTOX позволяет количественно определять цитолиз клеток-мишеней, опосредованный Т-клетками, с помощью проточной цитометрии. Мертвые/умирающие клетки обнаруживаются окрашиванием мертвых клеток (SYTOX[®] AADvanced, Life Technologies, S10274), которое проникает только в клетки с поврежденными плазматическими мембранами, но не может проникать через интактные клеточные мембраны здоровых клеток. Клетки-мишени NALM-6 были помечены красителем CTV (Cell Trace VioletTM, Life Technologies, C34557) и, таким образом, были отличимы от немеченых эффекторных Т-клеток. Мертвые/умирающие клетки-мишени идентифицируются путем двойного окрашивания красителем мертвых клеток и красителем для живых клеток.

Через 16 ч совместного культивирования эффекторных и меченных CTV клеток-мишеней *in vitro* при указанных соотношениях эффектор-мишень (Е:Т, 1:1 или 10:1) клетки окрашивали SYTOX[®] AADvancedTM и собирали на FACSLyticTM (BD). Результаты уничтожения представлены в виде % уменьшения клеток-мишеней, который рассчитывается с учетом количества живых клеток-мишеней (количество в образцах) в тестовых образцах по сравнению с живыми клетками-мишенями в контрольных лунках без добавления эффекторных клеток (максимальное количество):

$$\% \text{ целевого снижения} = 100 - ((\text{количество образцов/максимальное количество}) \times 100)$$

Пример 2. Дизайн антигена.

Гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетки поликлональны с поликлональностью CDR3. Чтобы избежать ситуации, когда полученные антитела будут отбираться к последовательности CDR3 (поскольку последовательность CDR3 будет отличаться от клона TCR к клону TCR), дизайн антигена включал поддержание согласованного CDR3 в разных форматах. Этот дизайн направлен на создание антител, распознающих последовательность в переменном домене, который кодируется зародышевой линией и, следовательно, одинаков для всех клонов, обеспечивая, таким образом, антитела, которые распознают более широкое под-

множество $\gamma\delta$ Т-клеток.

Другим важным аспектом способа получения антигена была разработка антигенов, которые подходят для экспрессии в качестве белка, $\gamma\delta$ TCR представляет собой сложный белок, включающий гетеродимер с межцепочечными и внутрицепочечными дисульфидными связями. Формат лейциновой молнии (LZ) и формат Fc использовали для получения растворимых антигенов TCR, которые будут использоваться при отборе фагового дисплея. Оба формата LZ и Fc хорошо экспрессируются и успешно отображают TCR (особенно гетеродимерные TCR, например, V δ 1V γ 4).

Было обнаружено, что последовательность CDR3 из общедоступной базы данных для $\gamma\delta$ TCR экспрессируется хорошо, как и белки (записи банка данных RCSB: 3OMZ). Поэтому она была выбрана для получения антигена.

Антигены, содержащие варибельную цепь дельта 1, были экспрессированы в форматах LZ как гетеродимер (то есть, в комбинации с различными варибельными цепями гамма - "L1", "L2", "L3") и в формате Fc либо как гетеродимер ("F1", "F2", "F3") или как гомодимер (т.е. в комбинации с другой варибельной цепью дельта 1 - "Fc1/1"). Все варибельные цепи дельта 1 антигенов содержали CDR3 3OMZ. Другая серия антигенов $\gamma\delta$ TCR с использованием аналогичных форматов была разработана, содержа различные варибельные цепи дельта (например, варибельная цепь дельта 2 и варибельная цепь дельта 3), и использовалась для отрицательного отбора антител с неспецифическим или нецелевым связыванием ("L4", "F9", "Fc4/4", "Fc8/8"). Эти антигены также были сконструированы так, чтобы включать 3OMZ CDR3, чтобы гарантировать, что антитела, связывающиеся в области CDR3, также были отрицательно отобраны.

Функциональная проверка антигена была проведена для подтверждения того, что сконструированные антигены будут подходить для создания антител к TRDV1 (TCR варибельная цепь дельта 1). Обнаружение было замечено только с антигенами, содержащими домен δ 1 (фиг. 1).

Пример 3. Фаговый дисплей.

Отбор фагового дисплея выполняли против библиотек scFv человека с использованием любого формата гетеродимерного LZ TCR в 1 и 2 раундах с отрицательным отбором на гетеродимерных LZ TCR в обоих раундах. Или 1 раунд выполняли с использованием гомодимерного Fc-гибридного TCR с отрицательным отбором на Fc IgG1 человека с последующим 2 раундом на гетеродимерном LZ TCR с отрицательным отбором на гетеродимерном LZ TCR (см. табл. 2).

Таблица 2

Обзор вариантов фагового дисплея

Цель	1 раунд отбора	1 раунд отрицательного отбора	2 раунд отбора	2 раунд отрицательного отбора
DV1	bt-L1 (DV1-GV4)	L4 (DV2-GV4)	bt-L3 (DV1-GV8)	L4 (DV2-GV4)
DV1	bt-Fc1/1 (DV1-DV1)	Fc	bt-L1 (DV1-GV4)	L4 (DV2-GV4)

bt = биотин

Отбор проводили в фазе раствора с использованием 100 нМ биотинилированных белков. Для отрицательного отбора использовали небитинилированные белки с концентрацией 1 мкМ.

Успех отбора фагового дисплея анализировали с помощью поликлонального фагового ИФА (DELFA). Все выходы отбора DV1 показали желаемое связывание с мишенями Fc 1/1, L1, L2, L3, F1 и F3. Были обнаружены различные степени связывания с нецелевыми L4, F9, Fc 4/4, Fc 8/8 и Fc (см. фиг. 2A и B).

Пример 4. Отбор антител.

Хиты, полученные в примере 3, секвенировали (используя стандартные методы, известные в данной области техники). Было идентифицировано 130 уникальных клонов, которые показали уникальную комбинацию VH и VL CDR3. Из этих 130 уникальных клонов 125 показали уникальный VH CDR3, и 109 показали уникальный VL CDR3.

Уникальные клоны повторно собирали, и специфичность анализировали с помощью ИФА (DELFA). Панель из 94 уникальных связывающих scFv человека, которые связывают TRDV1 (L1, L2, L3, F1, F2, F3), но не TRDV2 (L4), были идентифицированы из выборки.

Был включен рейтинг родства выбранных связывающих, чтобы облегчить отбор клонов в будущем. Большое количество связывающих клонов показало аффинность в наномолярном диапазоне, реагируя с 25-100 нМ биотинилированным антигеном. Несколько связывающих клонов показали сильную реакцию с 5 нМ антигеном, что указывает на возможное однозначное наномолярное сродство. Некоторые связывающие клоны не показали реакции со 100 нМ антигеном, что указывает на аффинность в микромолярном диапазоне.

Цель отбора клонов для преобразования IgG заключалась в том, чтобы включить как можно больше клонов зародышевой линии и как можно больше различных CDR3. Кроме того, избегали возможных проблем в последовательностях, таких как гликозилирование, сайты связывания интегрин, сайты связы-

вания CD11c/CD18, неспаренные цистеины. Кроме того, были включены последовательности с различным средством.

Отобранные клоны подвергали скринингу на связывание с природным $\gamma\delta$ TCR, экспрессируемым на клеточной поверхности, с использованием $\gamma\delta$ T-клеток кожи, полученных от различных доноров. Клоны, выбранные для преобразования в IgG, показаны в табл. 3.

Таблица 3

Связывающие клоны DV1 для преобразования IgG

ID Клона	Тяжелая CDR1	SE Q ID NO.	Тяжелая CDR2	SE Q ID NO.	Тяжелая CDR3	SE Q ID NO.	Легкая CDR1	SE Q ID NO.	Легкая CDR2	SE Q	Легкая CDR3	SE Q ID NO.	100 нМ L1
1245_P01_E07	GFTFSDYY	38	ISSSGSTI	26	VDYADAFDI	2	QSIGTY	50	VAS	A1	QQSYSTLLT	14	162591
1252_P01_C08	GFTVSSNY	39	IYSGGST	27	PIELGAFDI	3	NIGSQS	51	YDS	A2	QVWDSSSDHVV	15	1977
1245_P02_G04	GDSVSSKSA	40	TYYRSKWST	28	TWGSYVDV	4	QDINDW	52	DAS	A3	QQSYSTPQVT	16	5896
1245_P01_B07	GFTFSDYY	41	ISSSGSTI	29	ENYLNAFDI	5	QSLSNY	53	AAS	A4	QQSYSTPLT	17	64271
1251_P02_C05	GFTFSSYA	42	ISGGGGTT	30	DSGVAFDI	6	QNIRTW	54	DAS	A5	QQFKRYPPT	18	65269
1141_P01_E01	GYSFTSYW	43	IYPGSDST	31	HQVDTRTADY	7	RSDVGGYNY	55	EVS	A6	SSYTSTSTLV	19	136780
1139_P01_E04	GDSVSSNSA	44	TYYRSKWYN	32	SWNDAFDI	8	QSISTW	56	DAS	A7	QQSYSTPLT	20	23786
1245_P02_F07	GDSVSSNSA	45	TYYRSKWYN	33	DYYSMDV	9	QSISSW	57	DAS	A8	QQSHSHPPT	21	10450
1245_P01_G06	GFTFSDYY	46	ISSSGSTI	34	HSWNDAFDV	10	QSISSY	58	AAS	A9	QQSYSTPDT	22	22474
1245_P01_G09	GDSVSSNSA	47	TYYGSKWYN	35	DYYSMDV	11	QSISTW	59	DAS	A10	QQSYSTPVT	23	18430
1138_P01_B09	GFTFSDYY	48	ISSSGSTI	36	HSWDAFDI	12	QDISNY	60	DAS	A11	QQSYSTPLT	24	29193
1251_P02_G10	GFTFSDYY	49	ISSSGSTI	37	HSWNDAFDI	13	QSISSH	61	AAS	A12	QQSYSTLLT	25	17053

Пример 5. Анализ SPR антител.

Подготовленные антитела IgG прошли через анализ связывания с клетками $\gamma\delta$, и 5 были отобраны для дальнейшей функциональной и биофизической характеристики. Анализ SPR выполняли для определения констант равновесной диссоциации (K_D). Сенсограммы взаимодействия тестируемого антитела с аналитом, а также подгонки в равновесном состоянии (при их наличии) представлены на фиг. 3. Связывание TS8.2 не было обнаружено с IgG с 80 RU, захваченным на чипе. Результаты сведены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты захвата IgG

Аналит	ID Клона	K_D (нМ)	K_D (M)
L1 (DV1-GV4)	1245_P01_E07	12,4	1.24e-08
L1 (DV1-GV4)	1252_P01_C08	100	1.00e-07
L1 (DV1-GV4)	1245_P02_G04	126	1.26e-07
L1 (DV1-GV4)	1245_P01_B07	341	3.41e-07
L1 (DV1-GV4)	1251_P02_C05	1967*	1.97e-06
L1 (DV1-GV4)	1139_P01_E04	251	2.51e-07
L1 (DV1-GV4)	1245_P02_F07	193	1.93e-07
L1 (DV1-GV4)	1245_P01_G06	264	2.64e-07
L1 (DV1-GV4)	1245_P01_G09	208	2.08e-07
L1 (DV1-GV4)	1138_P01_B09	290	2.90e-07
L1 (DV1-GV4)	1251_P02_G10	829	8,29e-07
L1 (DV1-GV4)	TS8.2 (коммерческое антитело к V δ 1)	44	4,40e-08

*Связывание 1252_P02_C05 не достигло насыщения, поэтому данные были экстраполированы

Пример 6. Анализ связывания с TCR.

Авторы изобретения разработали несколько анализов для применения для функциональной харак-

теристики выбранных антител. Первый анализ оценивал связывание с $\gamma\delta$ TCR путем измерения подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании антитела. Выбранные антитела тестировали против коммерческих антител к CD3 и к V δ 1, которые использовали в качестве положительного контроля, или против 1252_P01_C08 в качестве положительного контроля (для 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06 и 1245_P01_G09). Коммерческое анти-рап $\gamma\delta$ использовали в качестве отрицательного контроля, потому что это рап- $\gamma\delta$ антитело, распознающее все $\gamma\delta$ T-клетки независимо от варибельной цепи, и, следовательно, вероятно, будет иметь другой механизм действия.

Анализ проводили с использованием $\gamma\delta$ T-клеток кожи, полученных из трех различных донорских образцов (образцы с чистотой 94%, 80% и 57%). Результаты показаны на фиг. 4. Значения EC50 приведены в табл. 4 ниже.

Пример 7. Анализ дегрануляции T-клеток.

Второй анализ оценивал дегрануляцию $\gamma\delta$ T-клеток. Считается, что $\gamma\delta$ T-клетки могут опосредовать уничтожение клеток-мишеней путем активации апоптоза, опосредованной перфорин-гранзимом. Литические гранулы в цитоплазме $\gamma\delta$ T-клетки могут высвобождаться в направлении клетки-мишени при активации T-клетки. Следовательно, мечение клеток-мишеней антителами к CD107a и измерение экспрессии с помощью проточной цитометрии можно использовать для идентификации дегранулирующих $\gamma\delta$ T-клеток.

Как и в примере 6, выбранные антитела тестировали против коммерческих антител к CD3 и к V δ 1, которые использовали в качестве положительного контроля, или против 1252_P01_C08 в качестве положительного контроля (для 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06 и 1245_P01_G09). Антитела IgG2a, IgG1 и D1.3 использовали в качестве отрицательного контроля. Анализ проводили с использованием $\gamma\delta$ T-клеток кожи, полученных из трех различных донорских образцов (образцы с чистотой 94%, 80% и 57%). Результаты показаны на фиг. 5. Значения EC50 приведены в табл. 5 ниже.

Пример 8. Анализ уничтожения.

Третий анализ оценивал способность $\gamma\delta$ T-клеток, активированных выбранными антителами, уничтожать клетки-мишени.

Как и в примере 6, выбранные антитела тестировали против коммерческих антител к CD3 и к V δ 1, которые использовали в качестве положительного контроля, или против 1252_P01_C08 в качестве положительного контроля (для 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06 и 1245_P01_G09) и против антител к рап- $\gamma\delta$ в качестве отрицательного контроля. Антитела IgG2a, IgG1 и D1.3 также использовали в качестве изотипного контроля. Анализ проводили с использованием $\gamma\delta$ T-клеток кожи, полученных от двух доноров (чистота 94% и 80%), и результаты показаны на фиг. 6.

Результаты трех функциональных анализов, протестированных в примерах 6-8, суммированы в табл. 5.

Краткое изложение результатов функциональных анализов

ID Клона	Подавление TCR (EC50 мкг/мл - 3 донора)	Дегрануляция Т- клеток (EC50 мкг/мл - 3 донора)	Анализ уничтожения (EC50 мкг/мл - 2 или 3 донора)
1245_P01_E07	0.04-0.11	0.007-0.004	0,06
1252_P01_C08	0.02-0.03	0.001-0.0006	0,02
1245_P02_G04	0.01-0.05	0,002	0,10
1245_P01_B07	Положительный; 0,35 (только 1 донор)	Положительный; 0,1 (только 1 донор)	0,13
1251_P02_C05	Положительный; Н/О	Положительный; Н/О	Н/О*
1139_P01_E04	0.027-0.057	0,005	0.005-0.019
1245_P02_F07	0.032-0.043	0.001-0.002	0.006-0.018
1245_P01_G06	0.042-0.055	0,001	0.007-0.051
1245_P01_G09	0.029-0.040	0,001	0.003-0.008
1138_P01_B09	0.078-0.130	Н/О	0,055–0,199
1251_P02_G10	0,849; Н/О	Н/О	Н/О**
ОКТ3 (антитело к CD3)	0,03-0,04	0,001-0,008	0,05
TS8.2 (антитело к Vδ1)	0,48-0,8	0,07-0,16	Н/О*

Н/О: не может быть определено; Н/О*: не удалось определить, кривая титрования не достигла плато; Н/О**: Сниженный профиль уничтожения, EC50 не установлена

Пример 9. Картирование эпитопа.

Для определения эпитопа комплексов антиген/антитело с высоким разрешением белковые комплексы инкубировали с дейтерированными сшивающими агентами и подвергали мультиферментативному расщеплению. После обогащения сшитыми пептидами образцы анализировали масс-спектрометрией высокого разрешения (n-ЖХ-LTQ-Orbitrap MC), и полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения XQuest (версия 2.0) и Stavgox (версия 3.6).

После протеолиза трипсином, химотрипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1 (DV1-GV4)/1245_P01_E07 с дейтерированным d0d12, анализ MC/MC с помощью nLC-orbitrap обнаружил 13 перекрестно сшитых пептидов между L1 (DV1-GV4) и антителом 1245_P01_E07. Результаты представлены на фиг. 7.

После протеолиза трипсином, химотрипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1252_P01_C08 с дейтерированным d0d12, анализ MC/MC с помощью nLC-orbitrap обнаружил 5 перекрестно сшитых пептидов между L1 (DV1-GV4) и антителом 1252_P01_C08. Результаты представлены на фиг. 8.

После протеолиза трипсином, химотрипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1245_P02_G04 с дейтерированным d0d12, анализ MC/MC с помощью nLC-orbitrap обнаружил 20 перекрестно сшитых пептидов между L1 (DV1-GV4) и антителом 1245_P02_G04. Результаты представлены на фиг. 9.

После протеолиза трипсином, химотрипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1251_P02_C05 с дейтерированным d0d12, анализ MC/MC с помощью nLC-orbitrap обнаружил 5 перекрестно сшитых пептидов между L1 (DV1-GV4) и антителом 1251_P02_C05. Результаты представлены на фиг. 10.

Также было протестировано связывание эпитопа с другим антителом, ID Клона 1141_P01_E01. После протеолиза трипсином, химотрипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1141_P01_E01 с дейтерированным d0d12, анализ МС/МС с помощью nLC-orbitrap обнаружил 20 перекрестно сшитых пептидов между L1 (DV1-GV4) и антителом 1141_P01_E01. Результаты представлены на фиг. 11.

Сводка результатов картирования эпитопа представлена в табл. 6.

Таблица 6

Результаты картирования эпитопов для комплексов антиген/антитело	
ID Клона	Картирование эпитопа, нумерация аминокислот SEQ ID NO: 1
1245_P01_E07	5, 9, 16, 20, 62, 64, 72, 77
1252_P01_C08	50, 53, 59, 62, 64
1245_P02_G04	37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73, 77
1251_P02_C05	59, 60, 68, 72
1141_P01_E01	3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68, 69

Пример 10. Размножение V δ 1 Т-клеток.

Размножение изолированных $\gamma\delta$ Т-клеток исследовали в присутствии выбранных антител и антител сравнения. Антитела сравнения были выбраны из: Антитело ОКТ3 к CD3 в качестве положительного контроля, никаких антител в качестве отрицательного контроля или антитела IgG1 в качестве изотипического контроля. Для сравнения также были протестированы коммерчески доступные антитела к V δ 1, TS-1 и TS8.2.

Эксперимент 1.

Первоначальное исследование было проведено путем посева 70 000 клеток на лунку с помощью Complete Optimizer и цитокинов, как описано в "Получение $\gamma\delta$ Т-клеток" для $\gamma\delta$ Т-клеток из крови в Примере 1. Отобранные антитела и антитела сравнения были протестированы при различных концентрациях от 4,2 нг/мл до 420 нг/мл. Этот эксперимент проводили с использованием планшетов для тканевых культур, которые позволяют связывать/иммобилизовать антитела с пластиком.

Клетки собирали на 7, 14 и 18 дни, и общее количество клеток определяли с использованием счетчика клеток (NC250, ChemoMetec). Результаты представлены на фиг. 12. Жизнеспособность V δ 1 Т-клеток также измеряли при каждом сборе, и было показано, что все антитела поддерживают жизнеспособность клеток на протяжении экспериментов (данные не показаны). На 18 день также анализировали процентное содержание, количество клеток и кратное изменение количества V δ 1 Т-клеток. Результаты представлены на фиг. 13.

Как видно на фиг. 12, общее количество клеток, продуцируемых в культурах с антителами, неуклонно увеличивалось на протяжении всей культуры и было сопоставимо или лучше, чем у коммерческих антител к V δ 1. На 18 день доля V δ 1-положительных клеток в присутствии антител 1245_P02_G04 ("G04"), 1245_P01_E07 ("E07"), 1245_P01_B07 ("B07") и 1252_P01_C08 ("C08") в большинстве тестируемых концентраций была больше, чем в культурах, в которых присутствовали контрольные антитела ОКТ3, TS-1 или TS8.2 (см. фиг. 13A).

Эксперимент 2.

Последующий эксперимент был проведен на изолированных клетках в культуральном сосуде с цитокинами, как описано в "получение $\gamma\delta$ Т-клеток" в Примере 1. По сравнению с экспериментом 1 использовали другой культуральный сосуд, поверхность которого не способствует связыванию/иммобилизации антител. Отобранные антитела и антитела сравнения тестировали при различных концентрациях от 42 пг/мл до 42 нг/мл. Во время эксперимента 2 были получены результаты экспериментов, проведенных в трипликатах.

Клетки собирали на 7, 11, 14 и 17 дни, и общее количество клеток определяли, используя счетчик клеток, как и раньше. Результаты представлены на фиг. 14. На 17 день также анализировали процентное содержание, количество клеток и кратное изменение количества V δ 1 Т-клеток. Результаты представлены на фиг. 15.

Состав клеток, включая не V δ 1 клетки, также измеряли во время эксперимента 2. Клетки на 17 день собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии на поверхностную экспрессию V δ 1, V δ 2 и $\alpha\beta$ TCR. Пропорции каждого типа клеток в каждой культуре графически показаны на фиг. 16, а процентные значения представлены в табл. 6.

Таблица 7

Состав клеток на 17 день - процент живых клеток в каждой подгруппе

	$\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ -	V δ 1	V δ 2	не V δ 1/V δ 2	$\alpha\beta$
не АВ	63,00	18,17	0,86	7,10	0,37
ОКТ-3	25,63	50,43	0,25	20,13	1,13
IgG1	65,77	15,59	1,11	6,91	0,42
TS8.2 42 нг/мл	30,60	53,57	3,59	7,46	0,14
ТС-1 42 нг/мл	18,77	65,90	0,91	9,51	0,12
С08 42 нг/мл	0,79	96,43	0,08	2,51	0,05
С08 4,2 нг/мл	1,91	94,67	0,18	2,63	0,05
С08 420 пг/мл	8,47	80,57	0,28	8,42	0,04
С08 42 пг/мл	35,97	25,93	3,04	19,50	0,31
В07 42 нг/мл	0,94	95,57	0,46	2,73	0,05
В07 4,2 нг/мл	1,79	94,10	0,40	3,28	0,01
В07 420 пг/мл	3,08	91,80	0,29	3,94	0,02
В07 42 пг/мл	17,93	62,90	0,85	9,16	0,07
Е07 42 нг/мл	2,29	85,13	0,19	11,65	0,04
Е07 4,2 нг/мл	2,15	91,23	0,13	5,77	0,04
Е07 420 пг/мл	9,25	73,90	0,42	13,05	0,02
Е07 42 пг/мл	49,23	18,67	2,17	7,70	0,43
Г04 42 нг/мл	1,90	88,53	0,47	8,09	0,05
Г04 4,2 нг/мл	4,25	89,67	0,93	3,98	0,02
Г04 420 пг/мл	25,97	50,60	1,45	12,72	0,11
Г04 42 пг/мл	44,00	13,77	2,33	26,30	0,32
С05 42 нг/мл	25,00	42,03	3,75	13,67	1,32
С05 4,2 нг/мл	46,87	22,03	2,58	16,46	0,38
С05 420 пг/мл	33,53	44,60	2,23	11,13	0,22
С05 42 пг/мл	36,83	25,23	6,16	18,00	0,30

Как видно из этих результатов, доля V δ 1-положительных клеток больше в культурах с присутствующими В07, С08, Е07 и G04 по сравнению с контролями ОКТ3, ТС-1 или TS8.2. Следовательно, тестируемые антитела продуцируют и размножают V δ 1-положительные клетки более эффективно, чем коммерчески доступные антитела, даже если они присутствуют в культуре в низких концентрациях.

Клетки с 17 дня эксперимента 2 также анализировали на наличие дополнительных клеточных маркеров, включая CD3-CD56+, для идентификации присутствия естественных киллерных (NK) клеток и V δ 1 Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (т.е. CD27+). Результаты представлены в табл. 7.

Таблица 8

Состав клеток на 17 день - процентное содержание NK и CD27+ клеток

	% CD56+CD3-		% CD27+ V δ 1	
	Среднее	СОС	Среднее	СОС
нег АВ	66,33	8,49	92,43	1,58
ОКТ-3	7,90	1,04	99,03	0,14

IgG1	70,67	6,41	87,87	0,81
TS8.2 42 нг/мл	31,63	1,99	66,73	5,55
ТС-1 42 нг/мл	22,97	1,75	94,40	1,14
С08 42 нг/мл	1,00	0,15	98,17	0,31
С08 4,2 нг/мл	2,06	0,07	95,07	1,23
С08 420 пг/мл	8,63	1,64	88,43	3,65
С08 42 пг/мл	45,10	3,44	91,50	2,50
В07 42 нг/мл	1,40	0,39	95,47	1,37
В07 4,2 нг/мл	1,70	0,16	96,70	0,43
В07 420 пг/мл	3,47	0,38	95,17	0,86
В07 42 пг/мл	22,03	4,66	88,03	3,00
Е07 42 нг/мл	2,59	0,93	92,27	2,10
Е07 4,2 нг/мл	1,98	0,09	95,77	0,52
Е07 420 пг/мл	8,72	1,33	92,43	0,14
Е07 42 пг/мл	67,73	1,23	93,60	1,16
G04 42 нг/мл	2,20	0,32	93,80	0,36
G04 4,2 нг/мл	3,53	0,51	91,63	1,80
G04 420 пг/мл	30,53	5,00	81,37	3,11
G04 42 пг/мл	51,13	8,90	94,20	0,93
С05 42 нг/мл	37,17	6,53	93,80	0,87
С05 4,2 нг/мл	52,27	8,16	85,40	4,46
С05 420 пг/мл	37,93	1,57	90,83	2,01
С05 42 пг/мл	43,40	8,64	92,17	2,02

СОС: стандартная ошибка среднего

Пример 11. Функциональность V δ 1 Т-клеток.

V δ 1 Т-клетки, размноженные в присутствии выбранных антител, сохранили поликлональный репертуар областей CDR3 и также были протестированы на функциональность с использованием анализа уничтожения SYTOX-поток. Результаты представлены для клеток, полученных во время эксперимента 1 на 14 день с использованием клеток с соотношением эффектор-мишень (Е:Т) 10: 1 (фиг. 17А), и для клеток, полученных во время эксперимента 2 на 17 день (после замораживания-оттаивания) с использованием клеток с соотношением Е:Т 1:1 и 10:1 (фиг. 17В).

Как видно на фиг. 17, V δ 1-положительные клетки размножились в присутствии всех антител, эффективно лизируя клетки-мишени, что указывает на их функциональность даже после замораживания и оттаивания клеток.

Пример 12. Функциональность клеток после хранения.

Функциональность клеток после стадии замораживания, а затем оттаивания, также была исследована. Часть клеток была удалена из культуры на 17 день эксперимента 2 и заморожена. Затем клетки оттаивали и дополнительно размножали в культуре с IL-15. На фиг. 18 показано общее количество клеток после 7 дней культивирования клеток после замораживания-оттаивания для культур, контактировавших с антителами В07, С08, Е07, G04 или ОКТ-3 перед замораживанием. Все культуры показали способность к размножению после хранения. Культивирование продолжали до 42 дня, и в течение этого периода отслеживали общее количество клеток (результаты показаны на фиг. 19). Общее количество клеток сохранялось или увеличивалось в культурах, ранее подвергавшихся действию выбранных антител.

Пример 13. Исследования эквивалентности связывания модифицированных антител к V δ 1.

Исследование связывания с титрованием антигена на основе ИФА было предпринято для сравнения антитела 1245_P02_G04, полученного в НЕК, с его последовательностями и вариантами гликозилирования, полученными в СНО. В частности, были предприняты модификации каркаса, аллотипа, опосредованной шарниром эффекторной функциональности, гликозилирования Asn 297 и/или способа производства, которые затем были включены в это исследование. Схема анализа ИФА была следующей: Антиген включал антиген L1 (TRDV1/TRGV4); блокирующий буфер - 2% Marvel/ФСБ; mAb, разведенные в серии

разведений 1/2, начиная с 5 мкг/мл; инкубация антиген-антитело в планшетах для ИФА - 1 ч; промывка для удаления неспецифического связывания - 3 x ФСБ-Tween, затем 3 x ФСБ; используемые вторичные антитела - меченные DELFIA Eu античеловеческие IgG (PerkinElmer; № по каталогу: 1244-330; 50 мкг/мл) при разведении 1/500; после этого инкубация в течение 1 ч перед добавлением усиливающего раствора DELFIA (PerkinElmer, используется в соответствии с инструкциями); измерение с помощью флуорометрии с временным разрешением (TRF). Для антител, полученных в CHO, стандартные векторы экспрессии, содержащие кассеты тяжелой и легкой цепей, получали в условиях низкого содержания эндотоксина на основе анионообменной хроматографии. Концентрацию ДНК определяли путем измерения поглощения на длине волны 260 нм. Последовательности проверяли секвенированием по Сэнгеру (до двух реакций секвенирования на плазмиду в зависимости от размера кДНК). Для производства использовали адаптированные к суспензии клетки CHO K1 (первоначально из ATCC и адаптированные к бессывороточному росту в суспензионной культуре). Посевные клетки выращивали в среде определенного химического состава, не содержащей животных компонентов и сыворотки. Затем клетки трансфицировали векторами и реагентом для трансфекции, и клетки выращивали дальше. Супернатант собирали центрифугированием и последующей фильтрацией (фильтр 0,2 мкм), и антитело очищали с использованием MabSelect™ SuRe™ перед составлением состава. Чтобы получить пример дефукозилированного антитела, использовали протоколы, впервые описанные von Horsten HH et al. (2010) *Glycobiology* 20 (12): 1607-18 при экспрессии в CHO, описанной выше, до экспрессии и очистки. После изготовления и очистки дефукозилирование mAb подтверждали анализом на основе MS.

Результаты этого исследования представлены на фиг. 20. На оси ординат показан сигнал ИФА, а на оси абсцисс показаны использованные концентрации антигена Vδ1 (мкг/мл). Антитела, включенные в это исследование титрования, обрисованы в общих чертах, и для более подробной информации RSV = контрольное mAb к RSV (полученное в CHO). G04 = 1245_P02_G04 (получено в HEK, SEQ ID NO: 112). AD3 = вариант G04 (полученный в CHO; SEQ ID NO: 129 и содержащий последовательность варибельного домена SEQ ID NO: 131 и SEQ ID NO: 132 и содержащий константный домен SEQ ID NO: 133 и SEQ ID NO: 134). AD4 = шарнирно модифицированное AD3 (полученное в CHO; SEQ ID NO: 130 и содержащее константный домен SEQ ID NO: 133 и SEQ ID NO: 135). AD3gly = дефукозилированное AD3, полученное в модифицированной линии CHO. При всех титрованиях для всех вариантов наблюдали эквивалентное связывание антигена.

Пример 14. Исследования эквивалентности связывания антитела к Vδ1 на антигене Vδ1 зародышевой линии человека и его полиморфном варианте.

Сравнение исследования связывания на основе ИФА было предпринято для изучения связывания антитела к Vδ1 с антигеном Vδ1 зародышевой линии человека согласно базы данных IMGT (см. SEQ ID NO: 1) по сравнению со связыванием с полиморфным антигеном Vδ1 зародышевой линии человека (SEQ ID NO: 128). В частности, было выполнено сравнение связывания антител и перекрестной реактивности с антигеном L1 (содержащим каноническую последовательность зародышевой линии TRDV1/TRGV4) и L1 AV (вариант TRDV1/TRGV4, содержащий указанный полиморфизм зародышевой линии TRDV1). Результаты представлены на фиг. 21. Антитела указаны следующим образом: G04 = 1245_P02_G04 (SEQ ID NO: 112); G04 LAGA = G04 с модификацией Fc шарнира (L235A, нумерация G237A по EU; SEQ ID NO: 136). E07 LAGA = 1245_P01_E07 с L235A, G237A, SEQ ID NO: 137. C08 LAGA = 1252_P01_C08 с L235A, G237A, SEQ ID NO: 138, D1.3 = контроль. Было выполнено серийное разведение каждого антитела к указанным антигенам, и при всех разведениях для каждого варианта антитела наблюдали эквивалентное связывание с обоими антигенами. Показано эквивалентное связывание, наблюдаемое для одного примера разведения (1 нМ антитела) в указанной серии.

Пример 15. Связывание антител к Vδ1 вызывает увеличение секреции цитокинов Vδ1+ клетками.

Вкратце, все антитела разводили до 10 мкг/мл и инкубировали в течение ночи для связывания антител с планшетом перед промывкой. Полученные из кожи γδ Т-клетки от двух разных доноров получали, как описано в другом месте в данном документе (см. Пример 1; в частности, раздел о получении γδ Т-клеток кожи). Эти клетки кожи затем добавляли в планшеты для культивирования тканей (100000 клеток на лунку), содержащие связанные антитела, как указано. Клетки затем оставляли на один день до сбора супернатанта и хранения при -80°C. Для цитокинового анализа супернатантов использовали анализ MSD U-PLEX Human: Использовали K151TTK-1, K151UCK-1 (Mesoscale Diagnostics, Мэриленд). Антитела, использованные в этом исследовании, включали IgG1 (контроль, не связанный с Vδ1), B07 (1245_P01_B07), E07 (1245_P01_E07), G04 (1245_P02_G04; 1245) и C08 (1252_P01_C08). Результаты этого исследования представлены на фиг. 22. В частности, на фиг. 22 (А) и (В), соответственно, показаны количества TNF-альфа и IFN-гамма, обнаруживаемые в супернатанте при применении γδ Т-клеток кожи, и более высокие уровни, наблюдаемые при применении указанных антител к Vδ1.

Пример 16. Антитело к Vδ1 вызывало увеличение уровней/активности гранзима В в клетках Vδ1+.

Полученные из кожи γδ Т-клетки получали, как описано в другом месте в данном документе (см. Пример 1; раздел о получении γδ Т-клеток кожи). Клетки TNP-1 сначала загружали зондом GranToxiLux (проницаемый для клеток флуорогенный субстрат разработан для обнаружения активности гранзима В в

клетках-мишенях) в соответствии с инструкциями производителя (OncoImmunit, Inc. Гейтерсбург, США). Затем в клетки ТНР-1 вводили антитела, как показано на фиг. 23, при концентрации 10 мкг/мл перед смешиванием с полученным из кожи $\gamma\delta$ Т-клетками при соотношении мишень/эффектор 1:20. Затем сокультуры ненадолго центрифугировали для обеспечения быстрого образования конъюгата перед совместным культивированием в течение 1 ч и последующим проточным анализом в соответствии с протоколами GranToxiLux. Антитела, использованные в этом исследовании, включали IgG1 (контроль, не связанный с V δ 1), B07 (1245_P01_B07), E07 (1245_P01_E07), G04 (1245_P02_G04; 1245) и C08 (1252_P01_C08). Результаты представлены на фиг. 23 и подчеркивают более высокие уровни гранзима В в клетках-мишенях онкологического заболевания, наблюдаемые при применении указанных антител к V δ 1 к этой модельной системе совместного культивирования V δ 1+/ТНР-1.

Пример 17. Антитело к V δ 1 обеспечивает модуляцию и пролиферацию иммунных клеток в ткани человека.

Пункционные биопсии кожи человека (от пяти разных доноров) инкубировали в течение 21 дня в культуре с указанными антителами. Образцы кожи получали путем удаления подкожного жира и т.д., как описано в другом месте в данном документе (см. Пример 1; раздел, посвященный получению $\gamma\delta$ Т-клеток кожи). Повторные штампы от каждого донора затем помещали на решетки с углеродной матрицей, которые затем помещали в лунку G-REX6 (Wilson Wolf). Каждую лунку заполняли полной средой, как также описано в другом месте в данном документе. Для исследования и сравнения эффекта различных антител их добавляли на 0, 7, 14 день до рабочей концентрации 100 нг/мл. Через 21 день в культуре клетки собирали и анализировали проточной цитометрией. Результаты указанного исследования представлены на фиг. 24 и конкретно подчеркивают заметные различия в модулирующем эффекте различных антител: Порядок слева направо: V δ 1 TS8.2 = TS8.2 (Thermo Fisher); ОКТ-3 (Biolegend); C08 IgG1=1252_P01_C08; E07 =1245_P01_E07; G04 = 1245_P02_G04. На фиг. 24 (А) выделено среднее количество жизнеспособных пан- $\gamma\delta$ ТCR-положительных клеток, наблюдаемое в конце культивирования; результаты представлены в виде закрытой фракции (средний процент + стандартное отклонение) от общей популяции живых клеток, проанализированной с помощью проточной цитометрии. Стратегия гейтирования потока для анализа содержания пан- $\gamma\delta$ выглядит следующим образом: Синглеты > Живые клетки > пан- $\gamma\delta$ антитело (Miltenyi, 130-113-508). На фиг. 24 (В) выделено среднее количество жизнеспособных V δ 1+ ТCR-положительных клеток, наблюдаемое в конце культивирования; результаты представлены в виде закрытой процентной фракции (средний процент + стандартное отклонение) от общей популяции живых клеток, проанализированной с помощью проточной цитометрии. Стратегия гейтирования потока для анализа содержания V δ 1+ клеток выглядит следующим образом: Синглеты > Живые клетки > пан- $\gamma\delta$ (Miltenyi, 130-113-508) > V δ 1 (Miltenyi, 130-100-553). На фиг. 24 (С) выделено количество жизнеспособных дважды положительных клеток V δ 1+CD25+, наблюдаемых в конце культивирования; результаты представлены в виде закрытой фракции (средний процент + стандартное отклонение) от общей популяции живых клеток. Стратегия гейтирования потока для анализа содержания CD25 + V δ 1+ клеток выглядит следующим образом: Синглеты > Живые клетки > Pan $\gamma\delta$ (Miltenyi, 130-113-508) > V δ 1 (Miltenyi, 130-100-553) > CD25 (Miltenyi, 130-113-286). Объединенные результаты этого исследования суммируют дифференциальный эффект антител по изобретению, как описано в данном документе, относительно антител сравнения TS8.2 и ОКТ3. И хотя мы не связаны этой теорией, одна из возможных причин менее благоприятных эффектов, оказываемых TS8.2 или ОКТ3 на V δ 1+ клетки, может быть связана с пагубным эффектом, оказываемым этими молекулами сравнения на функцию иммунных клеток с течением времени в этой модельной системе.

Пример 18. Антитело к V δ 1 обеспечивает модуляцию и пролиферацию иммунных клеток в ТИЛ.

Были предприняты исследования для изучения антител к V δ 1, обеспечивающих модуляцию и пролиферацию лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль человека (ТИЛ). Для этих исследований биопсии опухоли почечно-клеточной карциномы человека (RCC) отправлялись свежими и обрабатывались при получении. В частности, ткань была разрезана на ~ 2 мм². В каждую пробирку Miltenyi С помещали до 1 г ткани вместе с 4,7 мл RPMI и ферментами из набора для диссоциации опухолей Miltenyi в концентрациях, рекомендованных производителем, за исключением фермента R, который использовали при 0,2-кратной концентрации для предотвращения расщепления соответствующих молекул клеточной поверхности. С-пробирки помещали в диссоциатор GenentMACSTM Octo с нагревателями. Была выбрана программа 37C_h_TDK_1 для диссоциации мягких опухолей. Затем гидролизат фильтровали через фильтр 70 мМ, чтобы получить суспензию отдельных клеток. RPMI, содержащий 10% FBS, добавляли к гидролизату для подавления ферментативной активности. Клетки промывали 2 раза RPMI/10% FBS и ресуспендировали для подсчета. Затем полученные клетки высевали в лунки TC (24-луночный G-REX, Wilson Wolf) из расчета 2,5×10⁶ на лунку. Затем клетки инкубировали без или без цитокинов и с антителами или без них в течение 18 дней. Антитела, включенные в исследование, показаны на фиг. 25. К ним относятся ОКТ3 (до 50 нг/мл) и 1252_P01_C08, также называемые в данном документе "C08" (до 500 нг/мл). При включении болюсные добавки этих антител добавляли на 0, 7, 11 и 14 день. Во время указанной инкубации среду заменяли свежей на 11 и 14 дни. Анализ проточной цитометрии выполняли в 0 день и

18 день для определения фенотипа лимфоцитов, а также кратного изменения количества клеток. Клетки сначала гейтировали на живые CD45+, а затем, как указано. В репликаты, в которые были включены рекомбинантные цитокины, их добавляли следующим образом. 0 День: IL-4, IFN- γ , IL-21, IL-1 β . Дополнительный IL-15 был включен на 7, 11, 14 день. Дополнительные IL-21 и IFN- γ были включены на 7 и 14 день соответственно. На фиг. 25 (A) показано кратное увеличение количества клеток V δ 1+ TIL после 18 дней культивирования в присутствии C08 или ОКТ3 с цитокиновой поддержкой (СК) и без нее, где указано. Эти результаты показывают существенное кратное увеличение количества клеток V δ 1+ TIL при применении антитела C08 или антитела сравнения ОКТ3 в присутствии цитокинов по сравнению с одним антителом или цитокинами. На фиг. 25 (B) показано увеличение общего количества клеток V δ 1 при последующем сборе. Эти результаты показывают существенное увеличение количества клеток V δ 1+ TIL после культивирования с C08 или антителом сравнения ОКТ3 в присутствии цитокинов по сравнению с одним антителом или цитокинами. На фиг. 25 (C) представлен пример стратегии гейтирования, используемой в проточном цитометрическом анализе клеток. Из популяции живых CD45+ клеток клетки гейтировали по лимфоцитам на основании их свойств прямого и бокового рассеяния (не показаны), затем $\gamma\delta$ T-клетки отделяли от $\alpha\beta$ T-клеток путем окрашивания на рецепторы T-клеток. Наконец, была определена доля клеток V δ 1 в общей популяции $\gamma\delta$ T-клеток. Пример данных для 18 дня показан для 2 указанных условий (\pm 1252_P01_C08): 64,3% клеток были CD45+, из этих CD45% клеток 53,1% были $\gamma\delta$ +, а из клеток $\gamma\delta$ 89,7% были V δ 1+. На фиг. 25 (D) представлен фенотипический профиль клеточной поверхности клеток V δ 1+ TIL при сборе. Более высокие уровни CD69 наблюдались после культивирования с антителом C08. На фиг. 25 (E) представлен анализ TIL $\gamma\delta$ -отрицательной, CD8-положительной фракции лимфоцитов в живых CD45-положительных гейтах при сборе. Таким образом, объединенные результаты подчеркивают модулирующие эффекты, обеспечиваемые антителом к V δ 1 по изобретению, описанным в данном документе, на популяции TIL.

Пример 19. Антитело к V δ 1 сообщало усиление цитотоксичности, опосредованной клетками V δ 1+, и цитотоксичности, специфичной для пораженных клеток.

Анализ цитотоксичности/активности и исследования проводили в модельных системах, включающих трикультуру эффекторных клеток V δ 1+, моноцитарных раковых клеток ТНР-1 и здоровых первичных моноцитов \pm антитела к V δ 1 (1245_P02_G04; 1245_P01_E07; 1252_P01_C08), как описано в данном документе и включая контроли (без mAb или D1.3), как показано на фиг. 26. Вкратце, все антитела разводили до 10 мкг/мл в ФСБ и инкубировали в течение ночи при 4°C в 384-луночных планшетах для ультравизуализации планшетов (Perkin Elmer) для связывания антител с планшетом перед промывкой ФСБ. Здоровые контрольные моноциты выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК; Lonza) путем отрицательного отбора с использованием магнитно-активированной сортировки клеток (MACS; Miltenyi Biotec). Моноциты и культивируемые клетки ТНР-1 (АТСС) окрашивали красителями живых клеток [0,5 мкМ] CellTrace Violet и CellTrace CFSE соответственно в течение 20 мин перед смешиванием в соотношении 1:1. Размноженные V δ 1 $\gamma\delta$ T-клетки, полученные из кожи, отделяли от сосудов для культур ткани и серийно разбавляли для создания диапазона соотношений эффекторных и целевых (Е:Т) перед добавлением к суспензиям клеток ТНР1: моноцитов. Суспензии клеток высевали в 384-луночные аналитические планшеты для получения конечной плотности посева 1000 ТНР-1 клеток на лунку, 1000 моноцитов на лунку и диапазона $\gamma\delta$ T-клеток (верхнее соотношение Е: Т 60:1). Чтобы определить количество живых ТНР-1 и здоровых контрольных моноцитов через 24 ч, конфокальные изображения были получены с использованием платформы высокого разрешения Opera Phenix, захватывающей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Количество живых клеток определяли на основе размера, морфологии, текстуры и интенсивности окрашивания живых клеток. Результаты представлены на фиг. 26. На фиг. 26 (A) представлено количество клеток ТНР-1 и моноцитов через 24 ч в тройном совместном культивировании с $\gamma\delta$ T-клетками в присутствии связанных с планшетом mAb или контролей, как указано. Количество клеток рассчитывали с помощью конфокальной микроскопии с высоким содержанием с использованием изображений живых клеток. На фиг. 26 (B) представлена гистограмма, предназначенная для выделения окна между специфическим уничтожением пораженных клеток и сохранением здоровых клеток при максимальном соотношении Е:Т (60:1) после 24 ч совместного культивирования: Левая гистограмма; кратное увеличение уничтожения пораженных клеток (ТНР-1) по сравнению с уничтожением здоровых клеток (первичных моноцитов человека). Правая гистограмма; те же данные, но представленные как процент увеличения количества уничтоженных по сравнению с контролем. На фиг. 26 (C) представлены табличные результаты, суммирующие процентное улучшение эффективности V δ 1 $\gamma\delta$ T-клеток, убивающих клетки-мишени ТНР-1 в присутствии mAb V δ 1 по сравнению с контролем без mAb, как рассчитано на фиг. (A). На фиг. 26 (D) представлены табличные результаты значений ЕС50, рассчитанных по фиг. (A), представленных в виде количества $\gamma\delta$ T-клеток, необходимого для 50% уничтожения клеток ТНР-1. Объединенные результаты и открытия, как показано на фиг. 26, подчеркивают способность описанных в данном документе антител повышать цитотоксичность и специфичность к пораженным клеткам клеток V δ 1+.

Пример 20. Мультиспецифические антитела вызывали усиление цитотоксичности, опосредованной эффекторными клетками V δ 1⁺; нацеливаясь на тканецентрический антиген, связанный с заболеванием.

Исследования цитотоксичности/эффективности были предприняты для изучения влияния мультиспецифических антител на совместные культуры эффекторных клеток V δ 1⁺ и клеток онкологического заболевания A-431. Клетки-мишени A-431 (EGFR⁺; ATCC) высевали в 384-луночный планшет для визуализации (Perkin Elmer) из расчета 1000 клеток/луночку и инкубировали при 37°C в течение ночи в DMEM (10% FCS). Указанные антитела и мультиспецифические антитела разбавляли до 10 мкг/мл и добавляли в планшет для анализа (конечная концентрация для анализа 2 мкг/мл). Размноженные V δ 1 γ δ T-клетки кожи отделяли от сосудов для культур тканей и серийно разбавляли для получения диапазона соотношений E:T (верхнее соотношение E:T 60:1) перед добавлением в аналитический планшет. Клетки A-431 инкубировали с V δ 1 γ δ T-клетками в присутствии антител или контролей при 30°C, 5% CO₂. После 24 ч инкубации для окрашивания клеток добавляли Hoechst 33342 (ThermoFisher) (конечная концентрация 2 мкМ). Чтобы определить количество живых клеток A-431, конфокальные изображения были получены с использованием платформы высокого контента Opera Phenix с захватом девяти полей зрения при 10x увеличении. Количество живых клеток определяли на основе размера, морфологии, текстуры и интенсивности окрашивания живых клеток. Исследования динамики эффектор/мишень (E:T) для определения соотношения ET, при котором 50% клеток-мишеней погибают в модельных системах± контроли, компараторы, антитела и мультиспецифические антитела, как указано. Результаты представлены на фиг. 27.

Во-первых, на фиг. 27 (A-D) представлен пример результатов совместного культивирования, где совместные культуры V δ 1+/A-431 были исследованы с мультиспецифическими антителами, содержащими биспецифические связывающие фрагменты анти-V δ 1 x анти-TAA (EGFr), где анти-V δ 1 связывающий домен VL+ VH (для первой мишени) объединен с доменом CH1-CH2-CH3 связывающего фрагмента анти-EGFr (для второй мишени). Контроли и компараторы используются, как указано; слева направо: Нет mAb = антитело не добавлено; D1.3 = D1.3 контроль; D1.3 IgG LAGA = D1.3+ L235A, G237A; D1.3 FS1-67 = варибельный домен D1.3 с константным доменом связывания EGFr плюс L235A, G237A (SEQ ID NO: 139); цетуксимаб (получено на месте). Более конкретно, на фиг. 27 (A) представлены результаты пятичасового совместного культивирования с вышеупомянутыми контролями, компараторами и следующими тестируемыми образцами: C08-LAGA = 1252_P01_C08 с L235A, G237A (SEQ ID NO: 138); C08 FS1-67 = 1252_P01_C08 в сочетании со связывающим доменом EGFr, содержащим L235A, G237A (SEQ ID NO: 140). На фиг. 27 (B) представлены эквивалентные данные пятичасовых совместных культивирований с вышеупомянутыми контролями, компараторами и следующими тестируемыми образцами: G04-LAGA = 1245_P02_G04 с L235A, G237A; G04 FS1-67 = 1245_P02_G04 в сочетании со связывающим доменом EGFr, содержащим L235A, G237A (SEQ ID NO: 141). На фиг. 27 (C) представлены эквивалентные данные пятичасовых совместных культивирований с контролями, компараторами и следующими тестируемыми образцами: E07-LAGA = 1245_P01_E07 с L235A, G237A; E07 FS1-67 = 1245_P01_E07 в сочетании со связывающим доменом EGFr, содержащим L235A, G237A (SEQ ID NO: 142). На фиг. 27 (D) представлена таблица, суммирующая процентное улучшение цитотоксичности V δ 1 γ δ T-клеток в присутствии контролей, компараторов и исследуемых препаратов в течение 5, 12 и 24 ч. Увеличение более чем на 450% может наблюдаться, когда антитела или их фрагменты, как описано в данном документе, представлены в мультиспецифическом формате.

Во-вторых, на фиг. 27 (E-H) представлены результаты примера, в котором изучали совместное культивирование V δ 1+/A-431 мультиспецифические антитела, содержащие биспецифические связывающие фрагменты анти-V δ 1 x анти-TAA (EGFr), где связывающий домен анти-V δ 1 (к первой мишени) включает полноразмерное антитело (VH-CH1-CH2-CH3/VL-CL), затем объединенное со связывающей частью scFv к EGFr (ко второй мишени). Контроли и компараторы используются, как указано; слева направо: Нет mAb = антитело не добавлено; D1.3 = контроль; D1.3 IgG LAGA = D1.3+ L235A, G237A; D1.3 LAGA цетуксимаб = D1.3 с L235A, G237A плюс scFv, производным от C-конца цетуксимаба (SEQ ID NO: 143); цетуксимаб (получено на месте). Более конкретно, на фиг. 27 (E) представлены результаты пятичасового совместного культивирования с вышеупомянутыми контролями, компараторами и следующими тестируемыми образцами: C08-LAGA = 1252_P01_C08 с L235A, G237A; C08 LAGA цетуксимаб = 1252_P01_C08 с L235A, G237A и с scFv, производным от C-конца цетуксимаба (SEQ ID NO: 144). На фиг. 27 (F) представлены результаты пятичасового культивирования с вышеупомянутыми контролями, компараторами и следующими тестируемыми образцами: G04-LAGA = 1245_P02_G04 с L235A, G237A; G04 LAGA цетуксимаб = 1245_P02_G04 с L235A, G237A и с scFv, производными от C-конца цетуксимаба (SEQ ID NO: 145). На фиг. 27 (G) представлены результаты пятичасового культивирования с контролями, компараторами и следующими тестируемыми образцами: E07-LAGA = 1245_P01_E07 с L235A, G237A; E07 LAGA цетуксимаб = 1245_P01_E07 с L235A, G237A и с scFv, производным от C-конца цетуксимаба (SEQ ID NO: 146). На фиг. 27 (H) представлена таблица, суммирующая процентное улучшение активности V δ 1 γ δ T-клеток в присутствии контролей, компараторов и исследуемых препаратов в течение 5, 12 и 24 ч. Увеличение более чем на 300% может наблюдаться, когда антитела или их фрагмен-

ты, как описано в данном документе, представлены в мультиспецифическом формате.

В-третьих, на фиг. 27 (I и J) показан пример альтернативного подхода к представлению данных. Конкретно показано процентное улучшение, обеспечиваемое мультиспецифическим антителом E07 FS1-67 (I) или C08 FS1-67 (J), относительно цитотоксичности эффекторных клеток V δ 1+ по отношению к клеткам EGFR+ относительно 24-часовой временной точки относительно всех компонентов и компараторов, как указано.

Пример 21. Мультиспецифические антитела вызывают усиление цитотоксичности, опосредованной V δ 1+, и цитотоксичности, специфичной для пораженных клеток; нацеливание на антиген, связанный с гемопэтическим заболеванием.

Анализ цитотоксичности/активности и исследования проводились в модельных системах, содержащих эффекторные клетки трикультуры V δ 1+ и раковые клетки Raji, а также здоровые первичные моноциты \pm мультиспецифические антитела, содержащие мультиспецифические антитела к V δ 1 x анти-ТАА (CD19) для того, чтобы определить, могут ли моноклональные антитела V δ 1, связанные с опухоль-ассоциированным антигеном (ТАА) в биспецифическом формате, усиливать уничтожение специфических клеток-мишеней V δ 1 γ δ Т-клетками. В частности, клетки Raji (CD19++; ATCC) инкубировали с V δ 1 γ δ Т-клетками в присутствии мультиспецифических антител V δ 1 x CD19. Все антитела разбавляли до 4 мкг/мл (конечная концентрация для анализа 1 мкг/мл) и добавляли в 384-луночный планшет для визуализации (Perkin Elmer). Размноженные V δ 1 γ δ Т-клетки, полученные из кожи, отделяли от сосудов для культур тканей и серийно разбавляли для получения диапазона соотношений эффектор и мишень (Е:Т). Клетки Raji окрашивали [0,5 мкМ] CellTrace Far Red перед смешиванием в соотношении 1:1 с титрованными V δ 1 γ δ Т-клетками. Суспензии клеток высевали в 384-луночные аналитические планшеты для получения конечной плотности посева 1000 клеток Raji на лунку и диапазона γ δ Т-клеток (верхнее соотношение Е:Т 30:1). Чтобы определить количество живых клеток Raji через 24 ч, конфокальные изображения были получены с использованием платформы высокого разрешения Opera Phenix, захватывающей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Количество живых клеток определяли на основе размера, морфологии, текстуры и интенсивности окрашивания живых клеток. Результаты представлены на фиг. 28. Используемые антитела и компараторы указаны. В частности, RSV IgG = не связывающий мотавизумаб контроль, G04 = 1245_P02_G04; E07 = 1245_P01_E07; D1.3 VHVL = D1.3 HEL с scFv к CD19 на С-конце тяжелой цепи (используемый модуль связывания scFv см. в SEQ ID NO: 157); G04 VHVL = 1245_P02_G04 LAGA на С-конце тяжелой цепи scFv к CD19 (SEQ ID NO: 158); E07 VHVL = 1245_P01_E07 LAGA на С-конце тяжелой цепи scFv к CD19 (SEQ ID NO: 159). Фиг. 28 (А). Таблица, суммирующая (i) рассчитанные EC50, представленные в виде числа γ δ Т-клеток или соотношений Е:Т, необходимых для индукции 50%-ного уничтожения клеток Raji, и (ii) процентное улучшение EC50 по сравнению с контролем без mAb. Фиг. 28 (В). Гистограмма, представляющая процентное улучшение способности γ δ Т-клеток лизировать 50% клеток-мишеней Raji в присутствии мультиспецифических антител V δ 1-CD19.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело к v δ 1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело к V δ 1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

а) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 64;

б) область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 76;

при этом область VH содержит CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 28, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 40, и область VL содержит CDR2, содержащую последовательность DAS, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 52; и при этом связывание антитела к v δ 1 оказывает активирующее действие на активность γ δ TCR.

2. Антитело к v δ 1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающееся тем, что область VL содержит CDR3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности SEQ ID NO: 16.

3. Антитело к v δ 1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, отличающееся тем, что область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 4, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 16.

4. Антитело к v δ 1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как определено в любом из пп.1-3, представляет собой scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, вариабельный домен (например, VH или VL), диатело, мини-тело или полноразмерное антитело.

5. Мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается по меньшей мере с двумя антигенами-мишенями, содержащее антитело к v δ 1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где первым по меньшей мере из двух антигенов-мишеней является V δ 1.

6. Антитело к vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, содержащие область VH и область VL, отличающиеся тем, что области VH и VL соединены линкером, таким как полипептидный линкер.

7. Мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, где антитело представляет собой антитело человека, и связывается по меньшей мере с двумя антигенами-мишенями, причем первый по меньшей мере из двух антигенов-мишеней представляет собой Vδ1, и при этом мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом Vδ1, содержащим один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислот 1-90 SEQ ID NO: 1.

8. Антитело к vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, отличающееся тем, что эпитоп содержит по меньшей мере один из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 1, возможно, где эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1, дополнительно возможно, где эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в аминокислотных областях: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

9. Антитело к vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.7 или 8, отличающееся тем, что эпитоп представляет собой активирующий эпитоп vδ T-клетки.

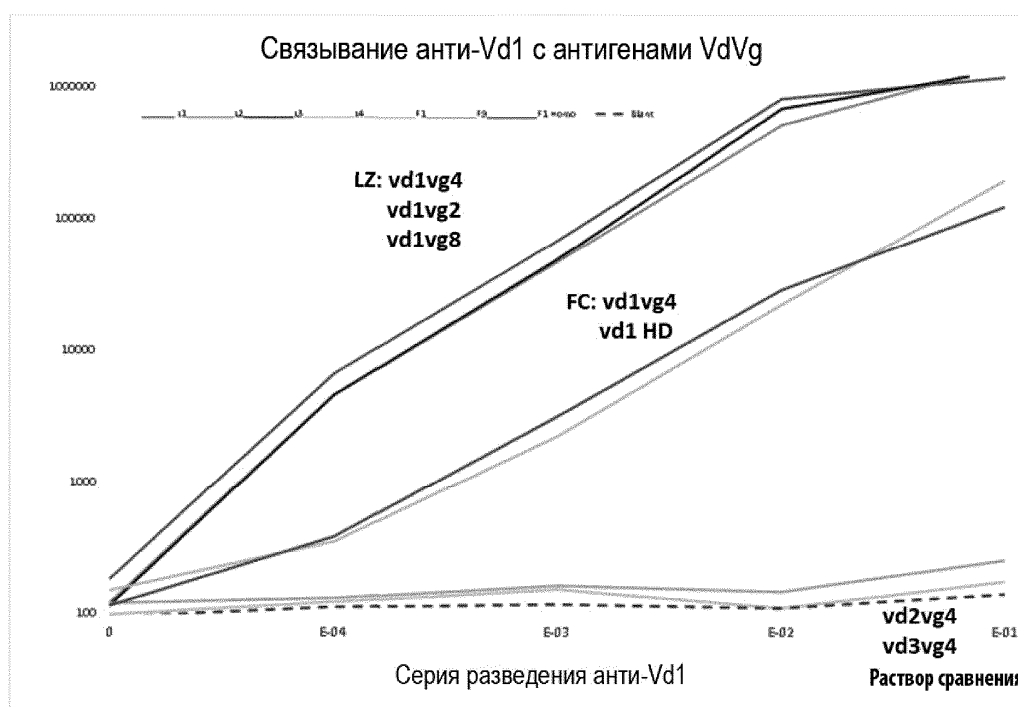
10. Антитело к vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или мультиспецифическое антитело по п.7, которое содержит VH область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и VL область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

11. Антитело к vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или мультиспецифическое антитело по п.7, которое содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 113.

12. Мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.5-11, отличающееся тем, что второе по меньшей мере из двух антигенов-мишеней выбран из группы, состоящей из EGFR и CD19.

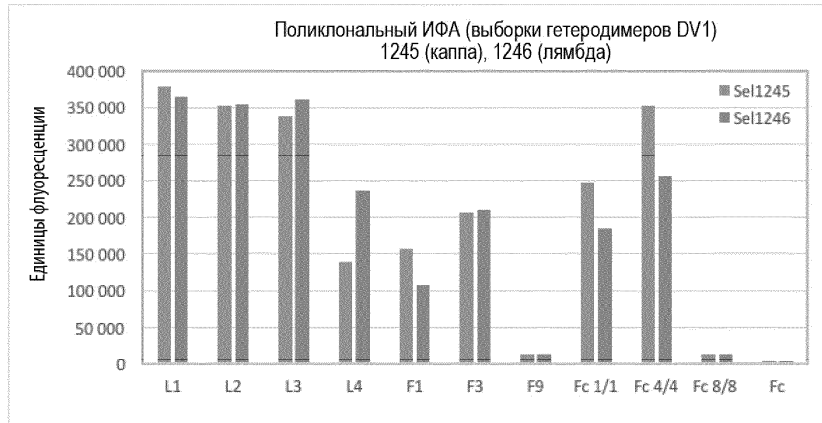
13. Применение антитела к vδ1 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-4, 6 или 8-11 или мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.5-12 в качестве лекарственного средства для лечения онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

14. Применение выделенного антитела к vδ1 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-4, 6 или 8-11 или мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.5-12 для лечения онкологического заболевания, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

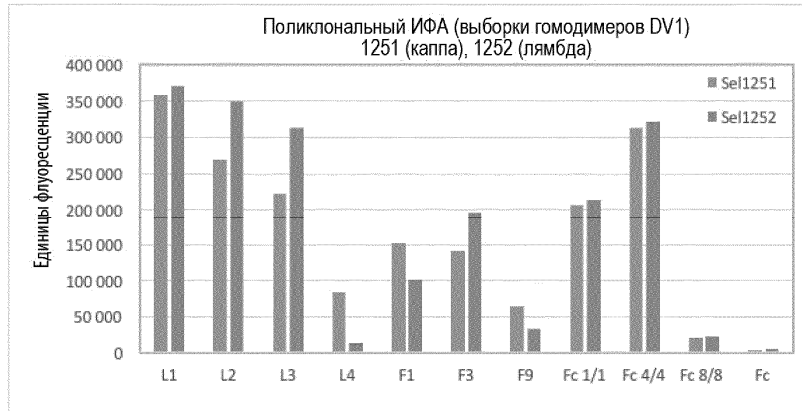


Фиг. 1

A

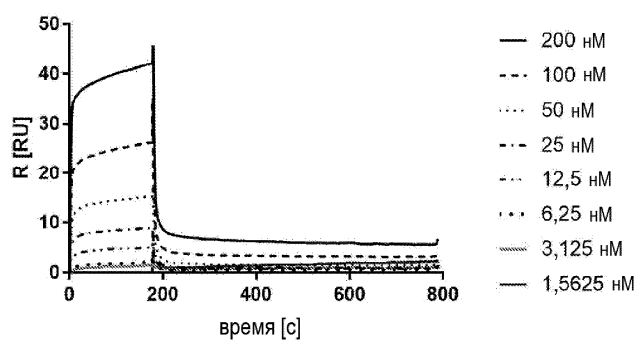


B

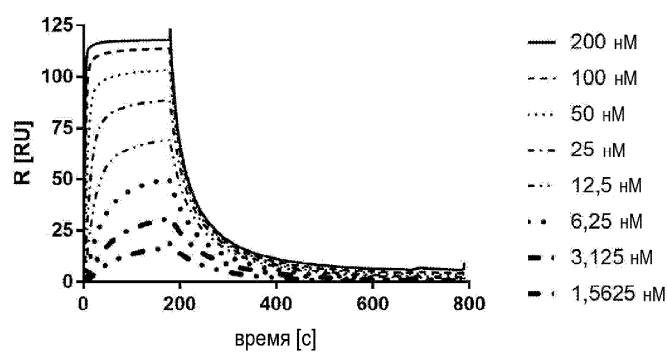


Фиг. 2

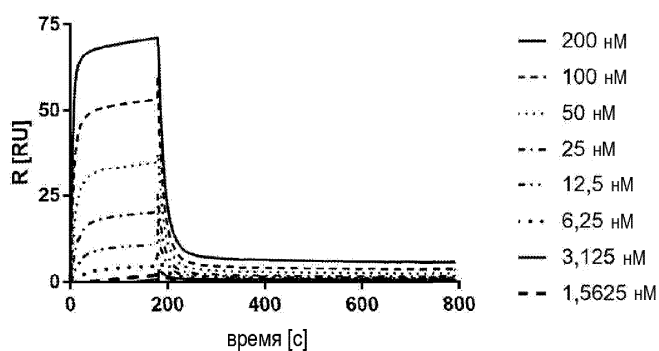
1245_P01_B07



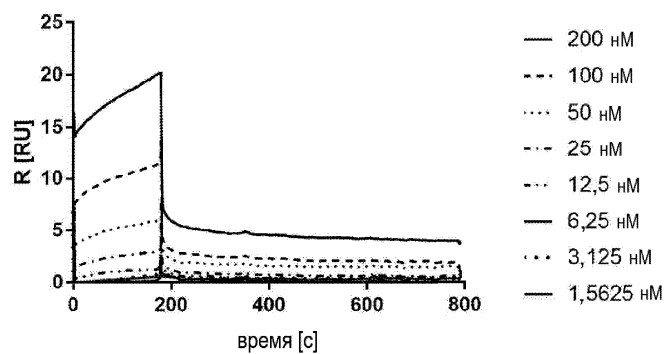
1245_P01_E07

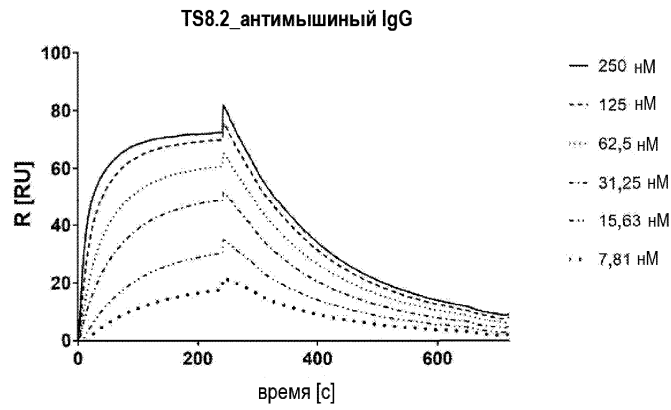
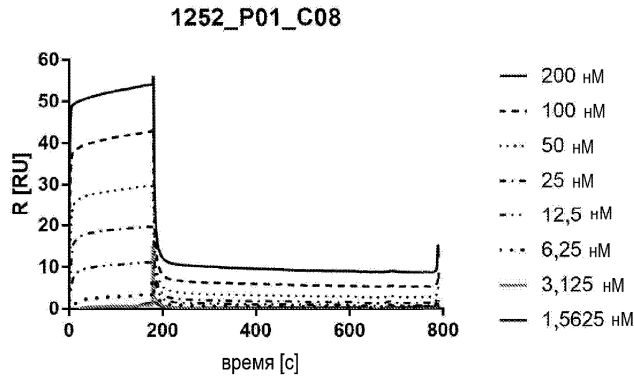


1245_P02_G04



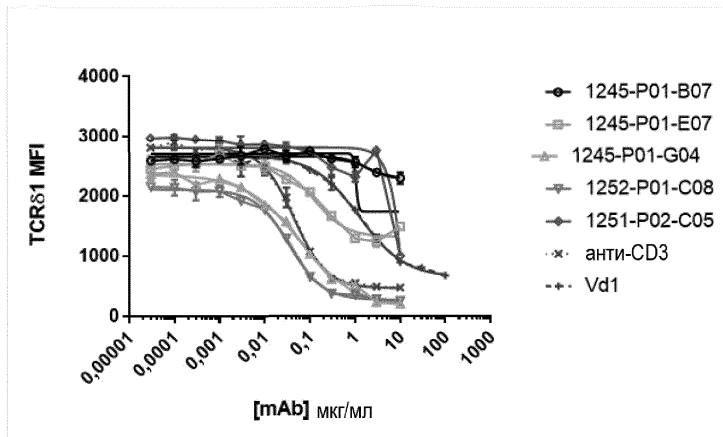
1251_P02_C05



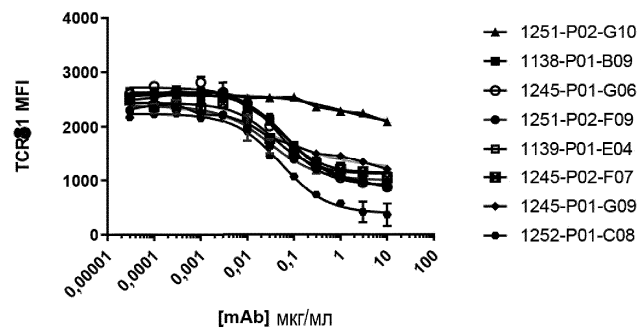


Фиг. 3

A)

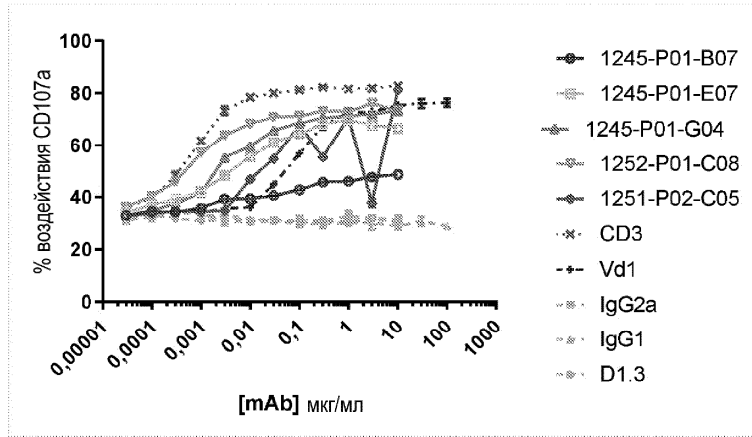


B)

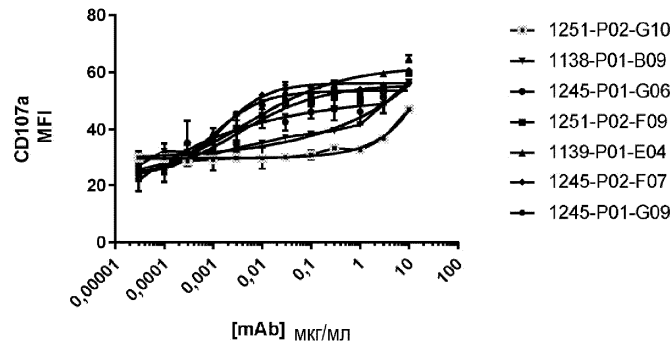


Фиг. 4

A)

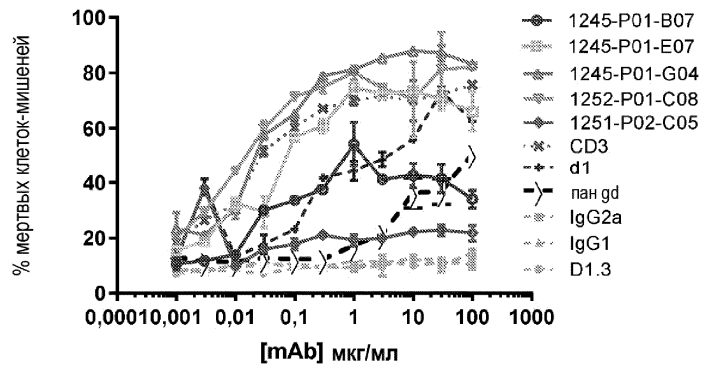


B)

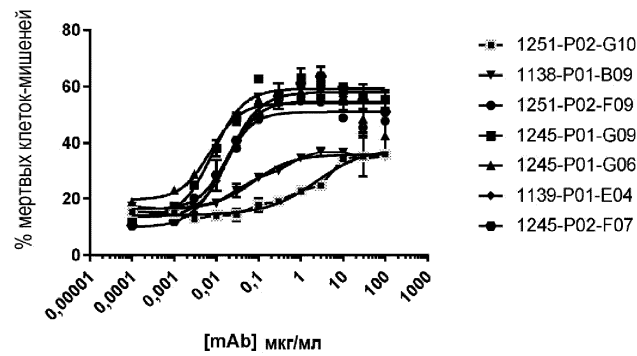


Фиг. 5

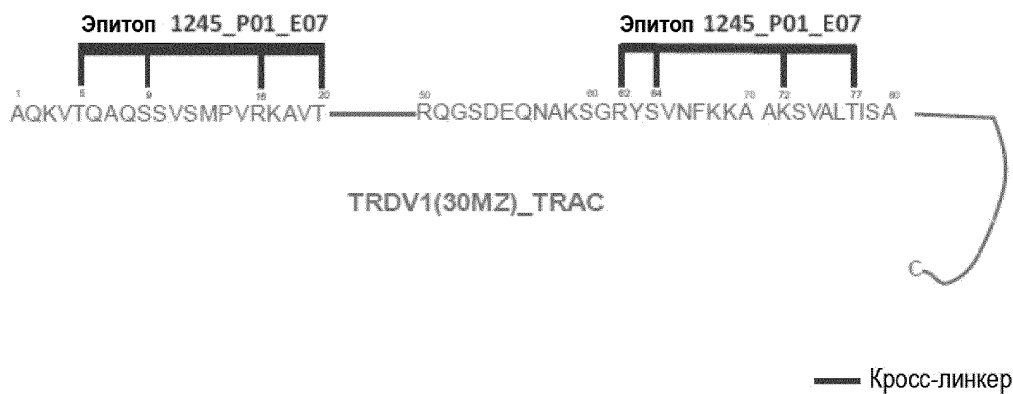
A)



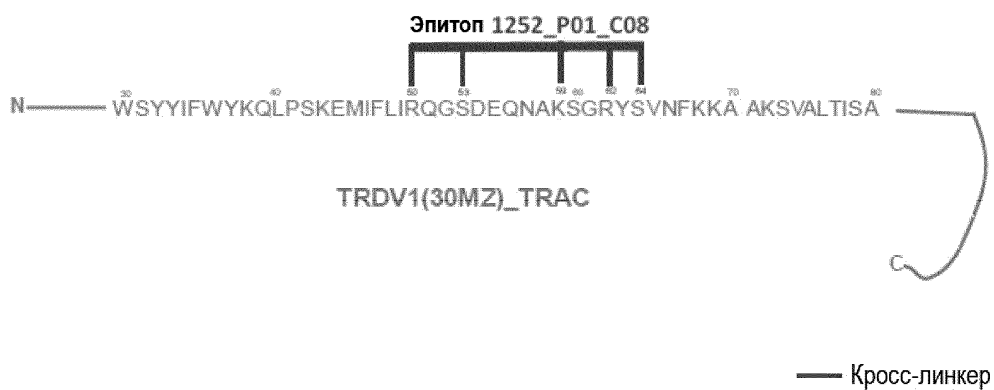
B)



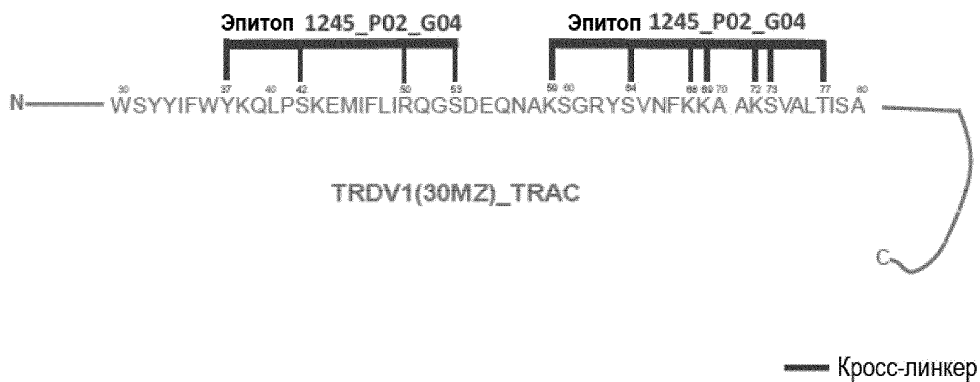
Фиг. 6



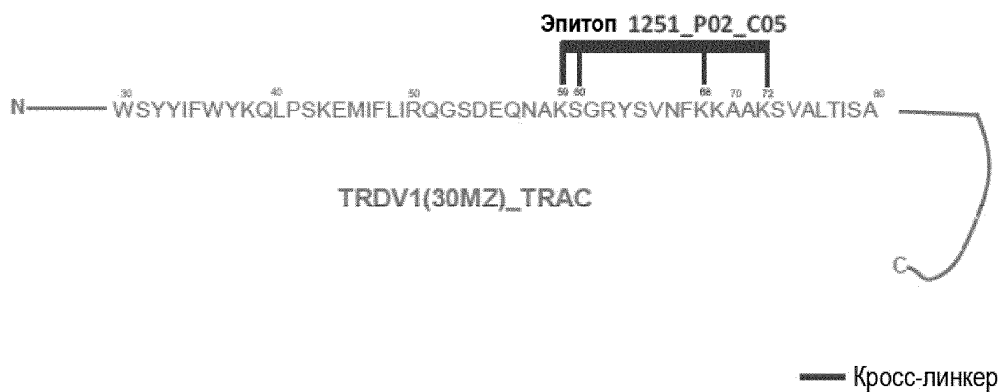
Фиг. 7



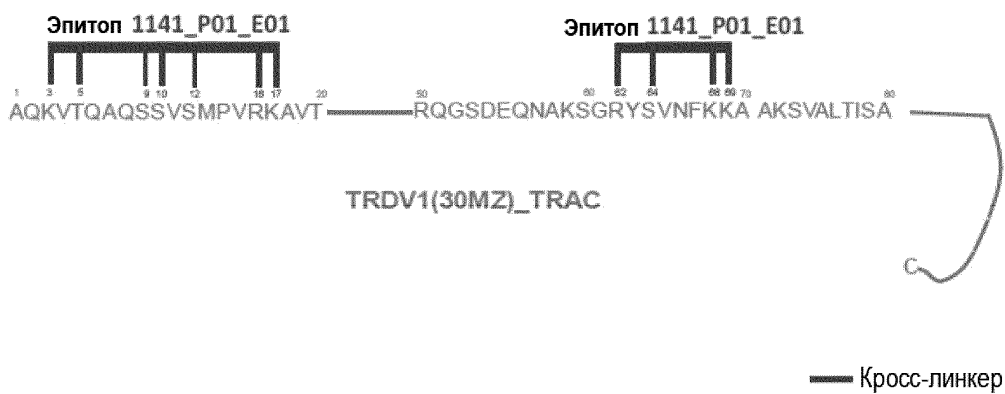
Фиг. 8



Фиг. 9

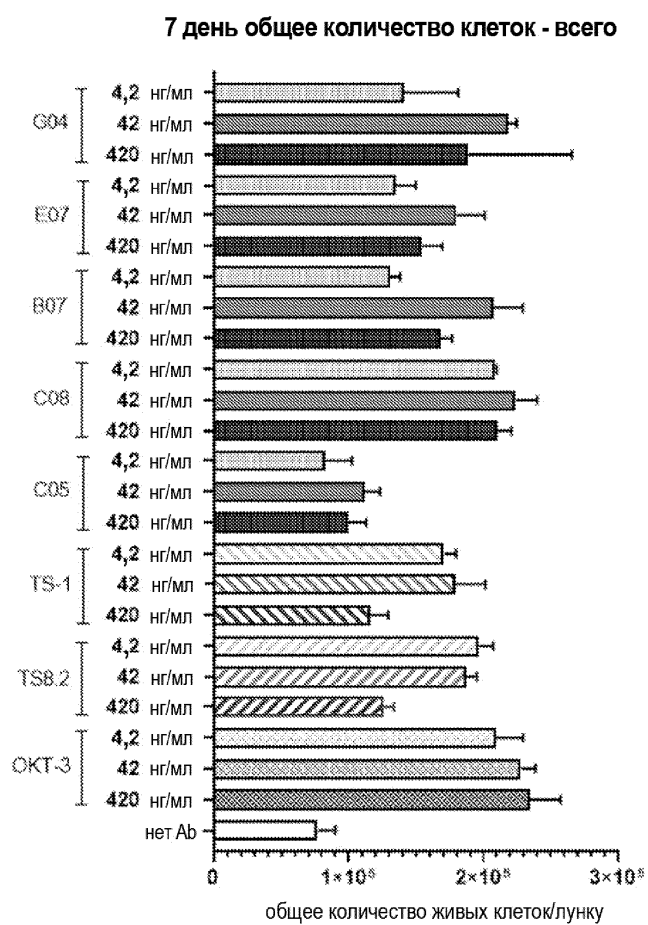


Фиг. 10



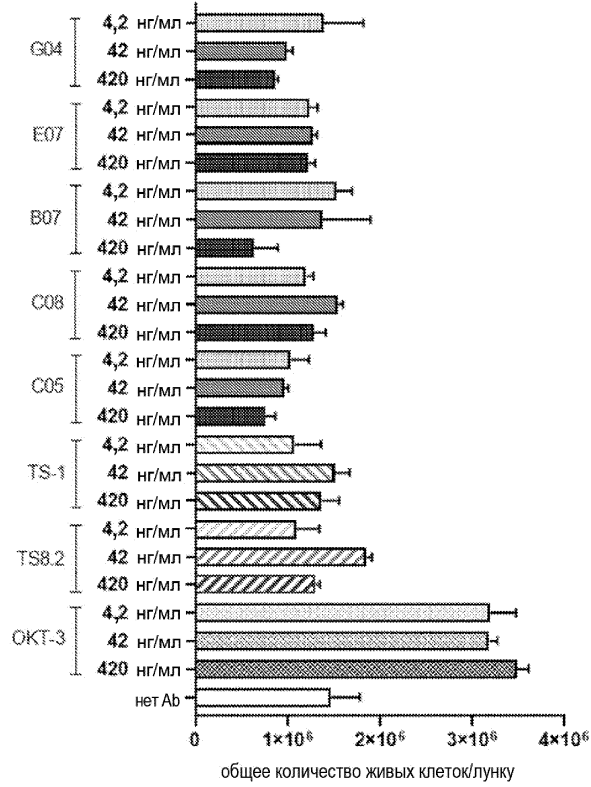
Фиг. 11

А)



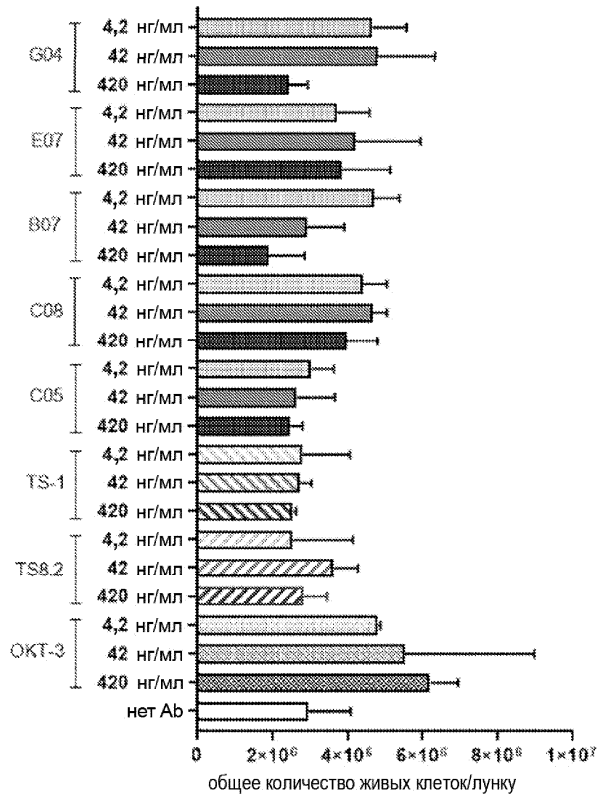
В)

14 день общее количество клеток - всего



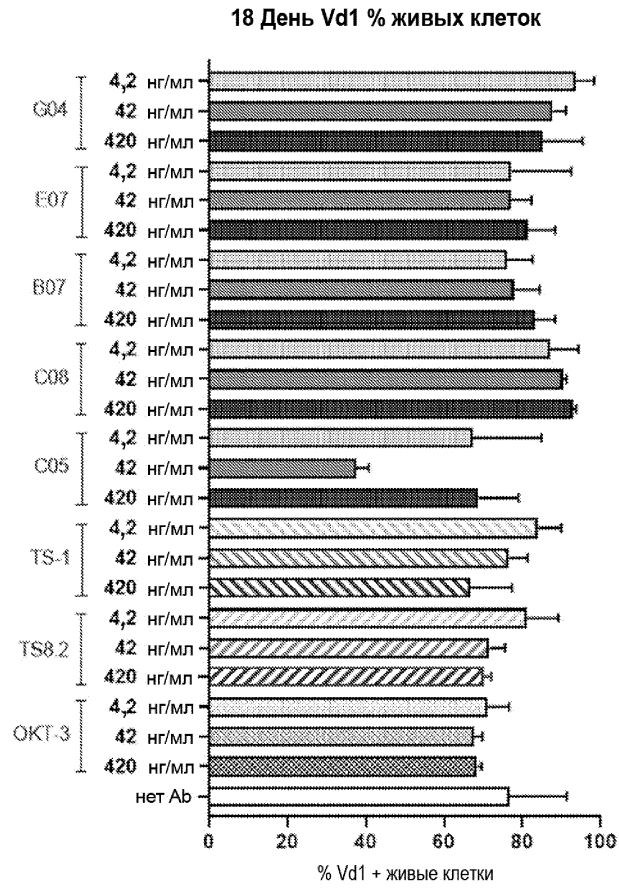
С)

18 день общее количество клеток - всего

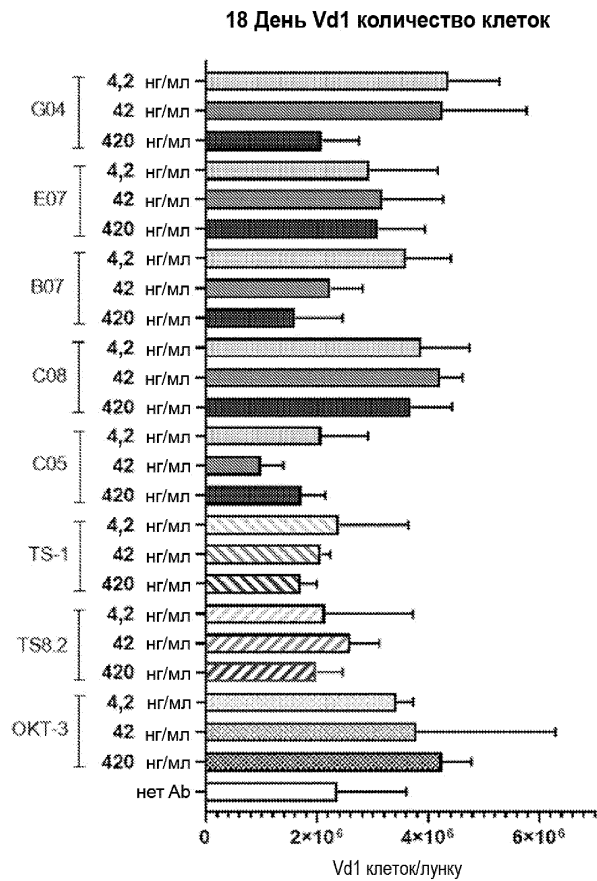


Фиг. 12

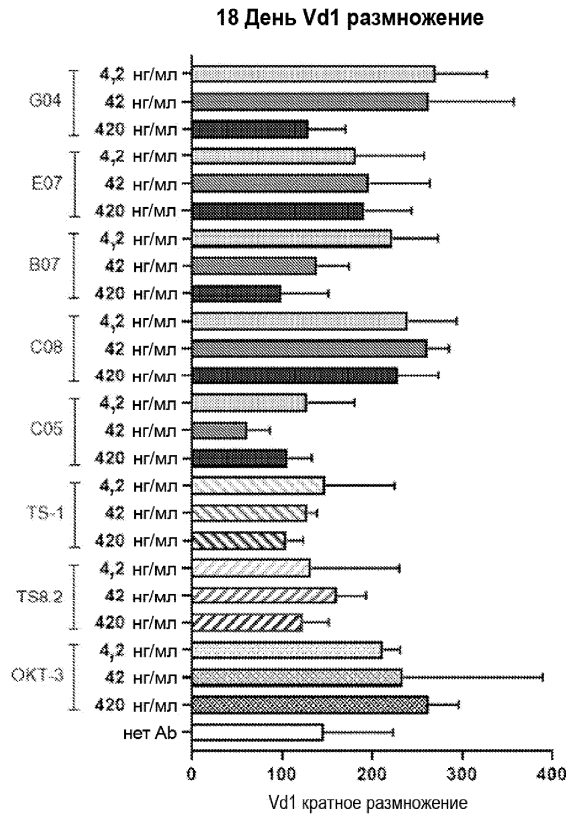
A)



B)

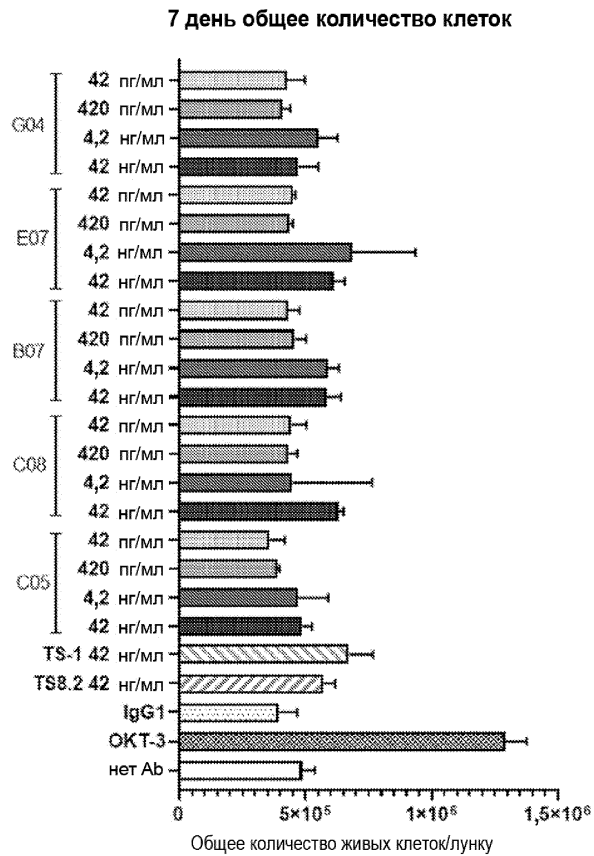


С)



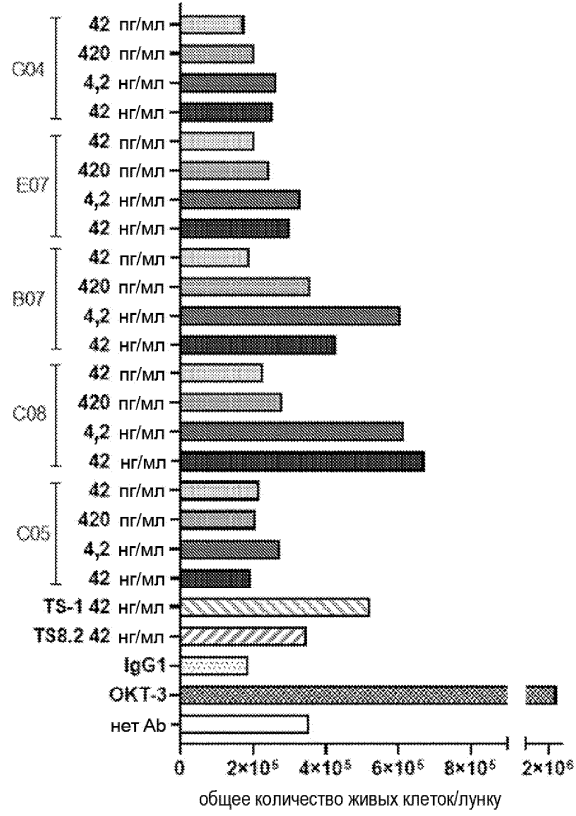
Фиг. 13

А)



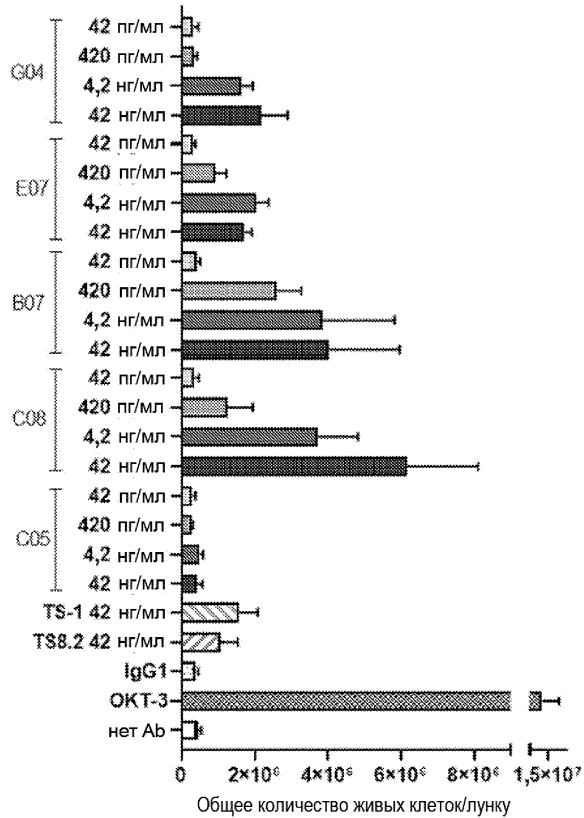
В)

11 день общее количество клеток



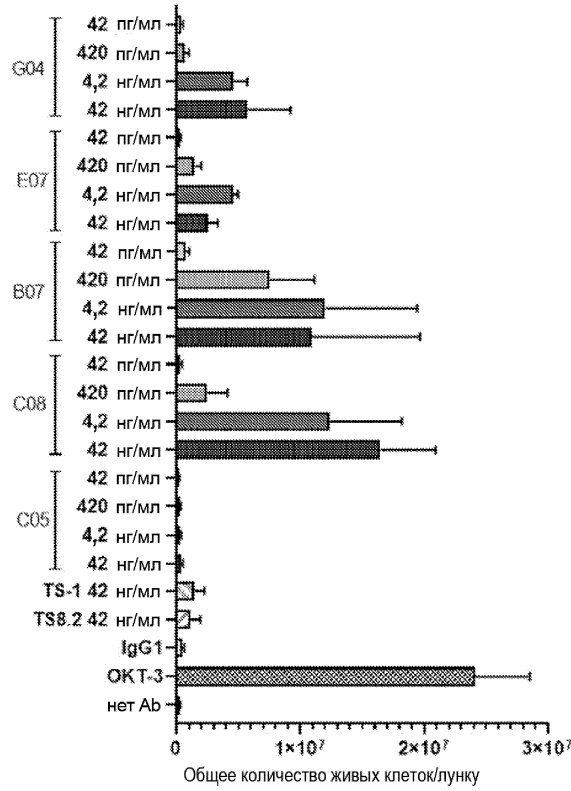
С)

14 день общее количество клеток



D)

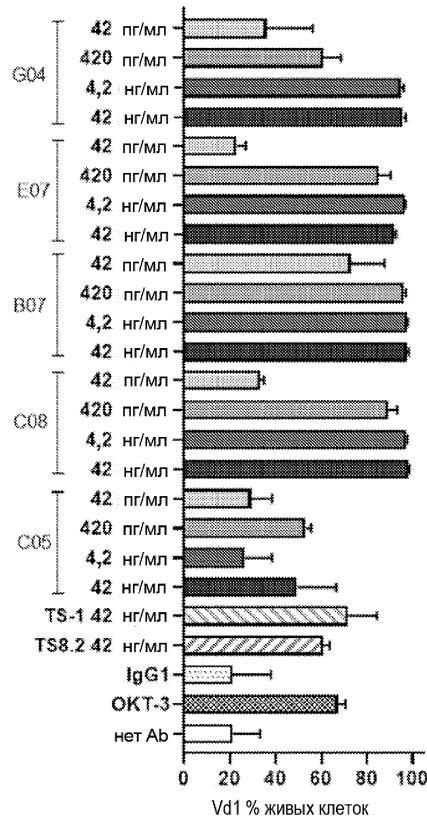
17 день общее количество клеток



Фиг. 14

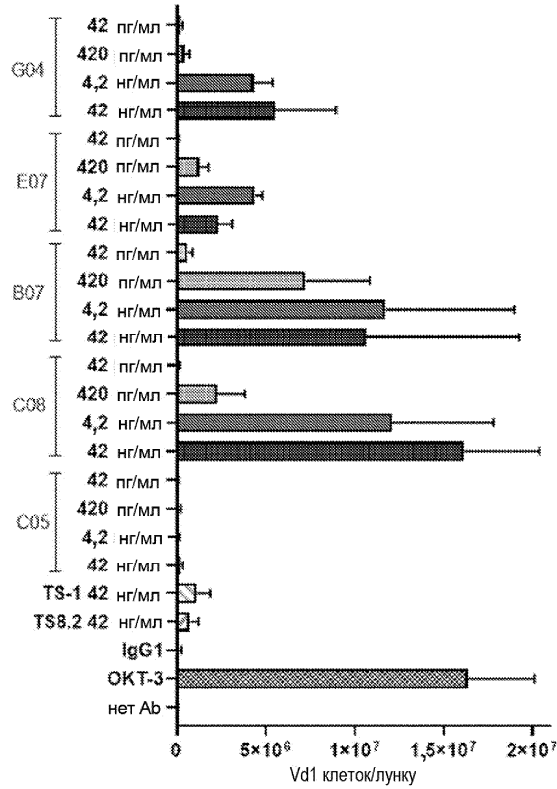
A)

17 день Vd1%



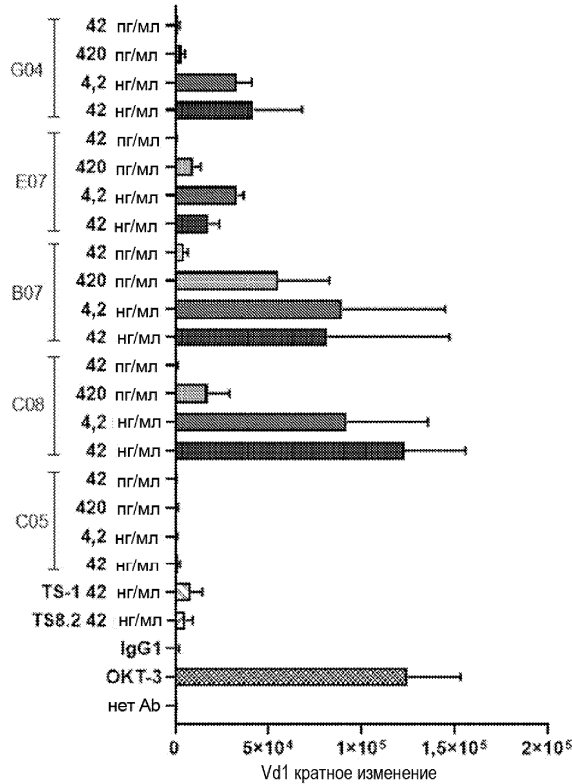
В)

17 день Vd1 количество клеток

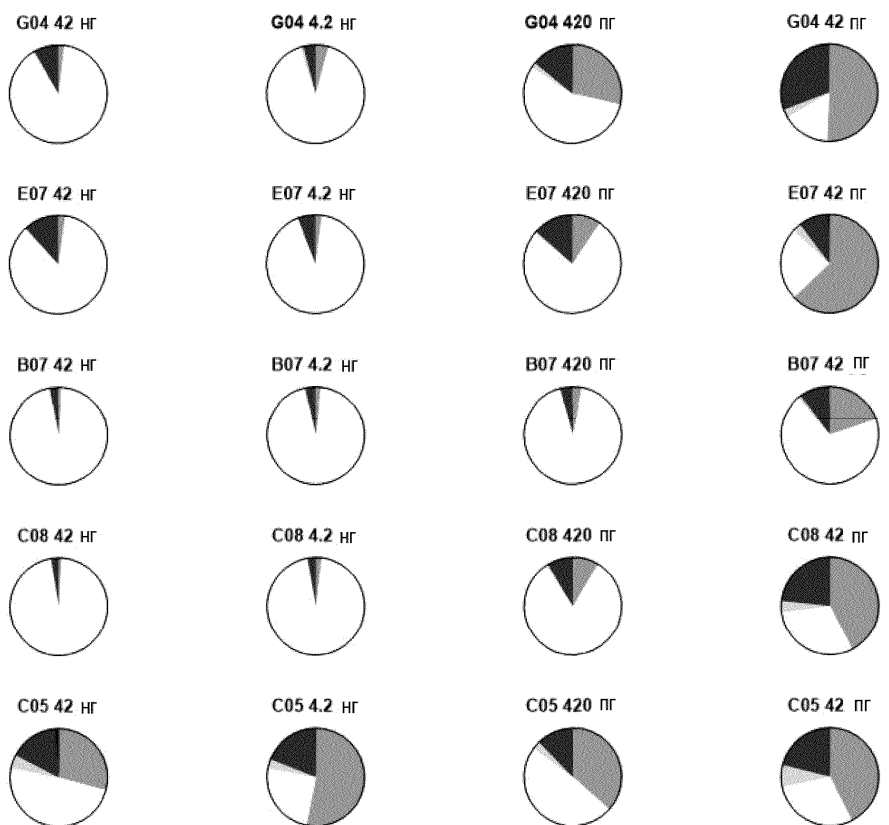


С)

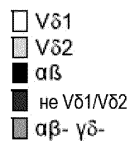
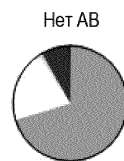
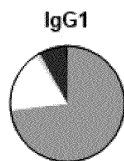
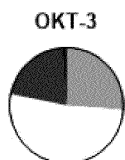
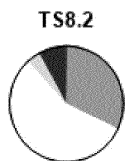
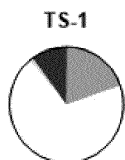
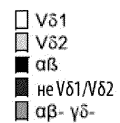
17 день Vd1 размножение



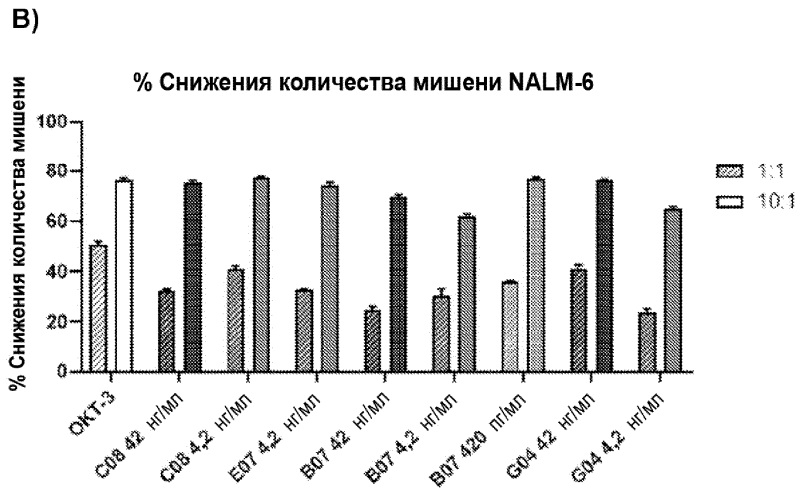
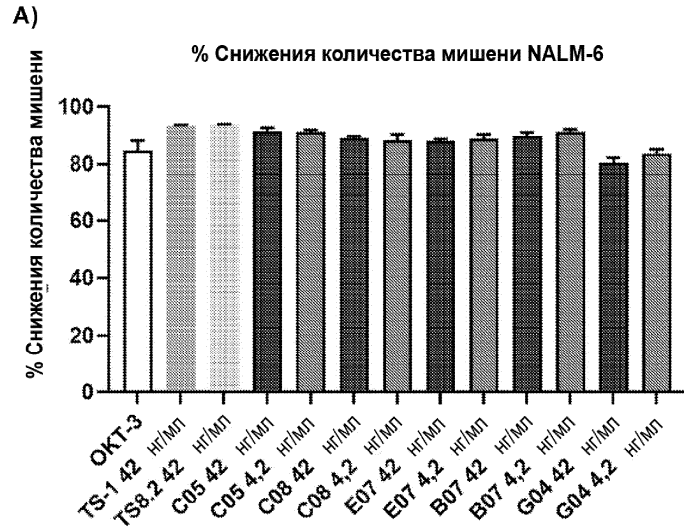
Фиг. 15



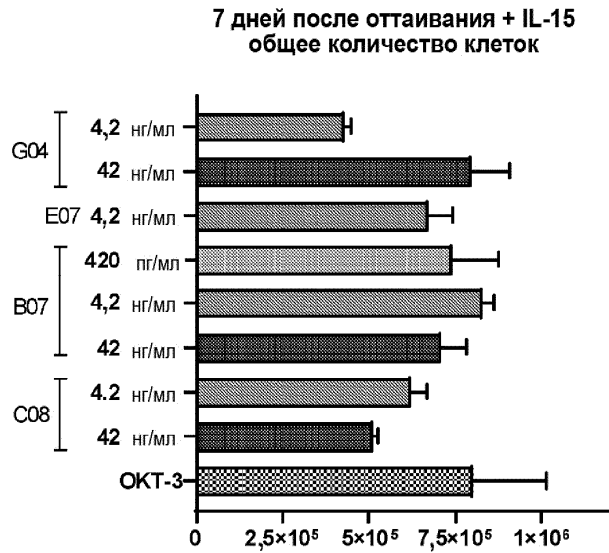
Концентрация aVd1



Фиг. 16

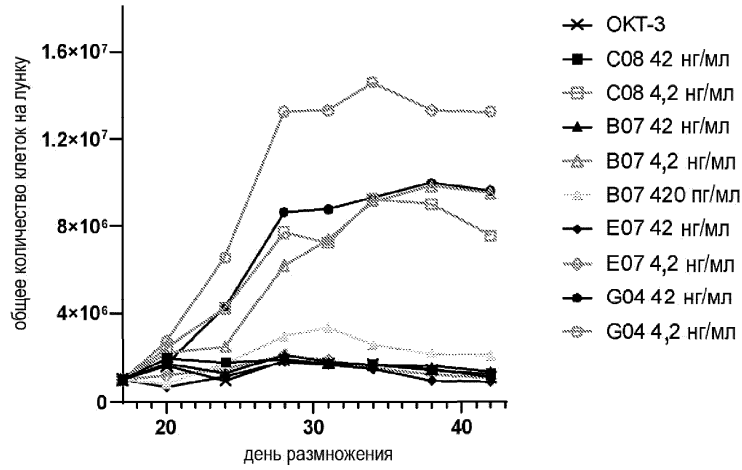


Фиг. 17

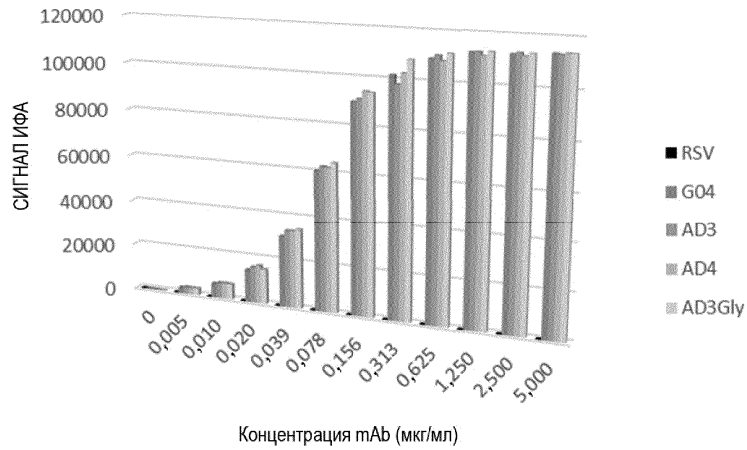


Фиг. 18

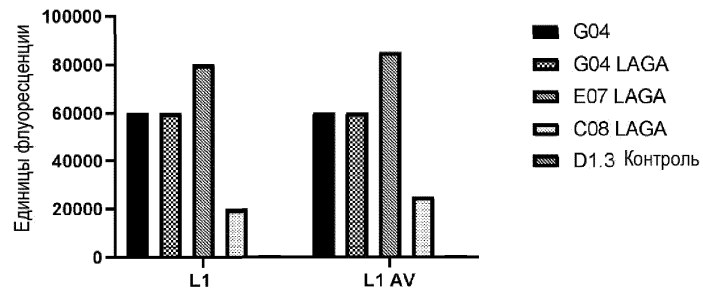
Размножение после повторного посева 17 День:
общее количество клеток



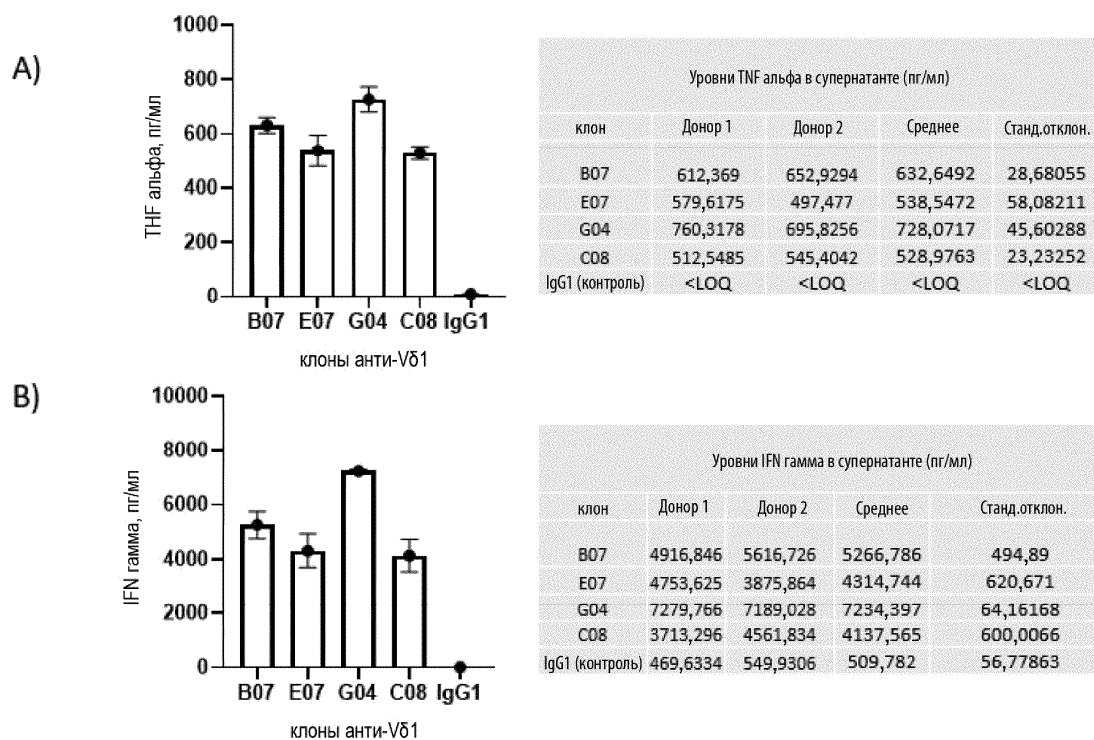
Фиг. 19



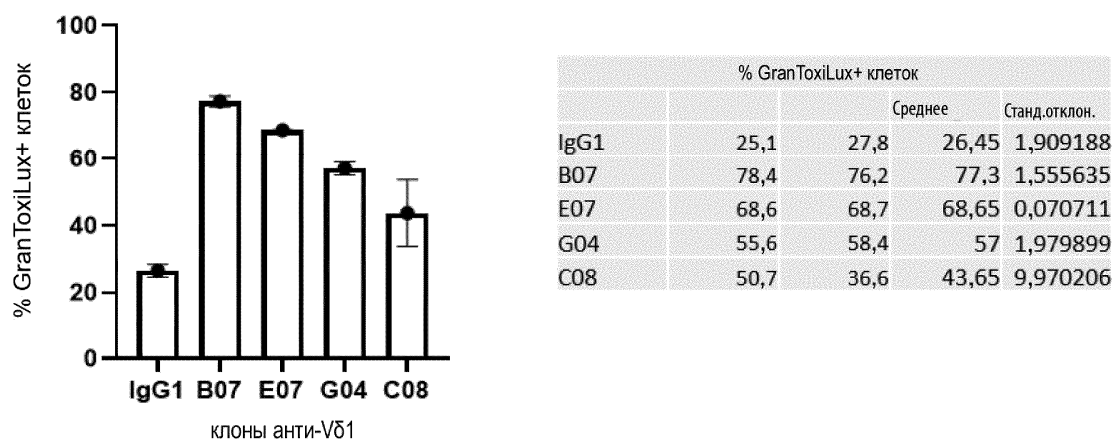
Фиг. 20



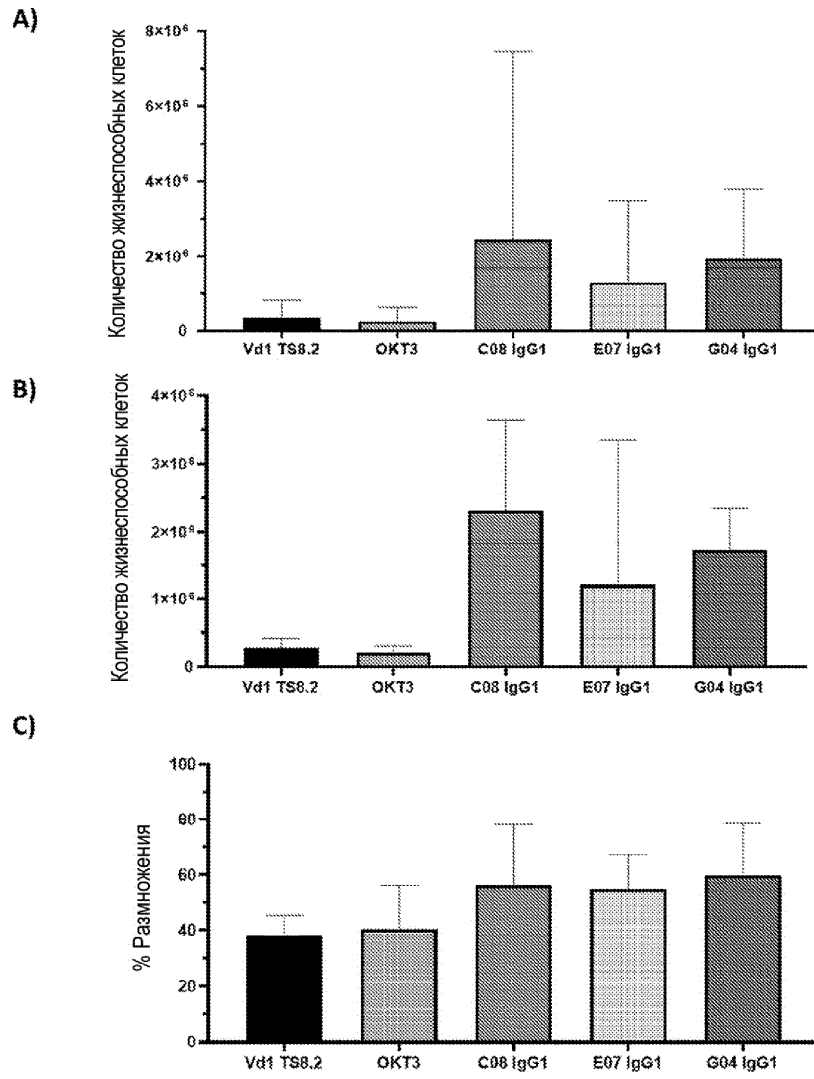
Фиг. 21



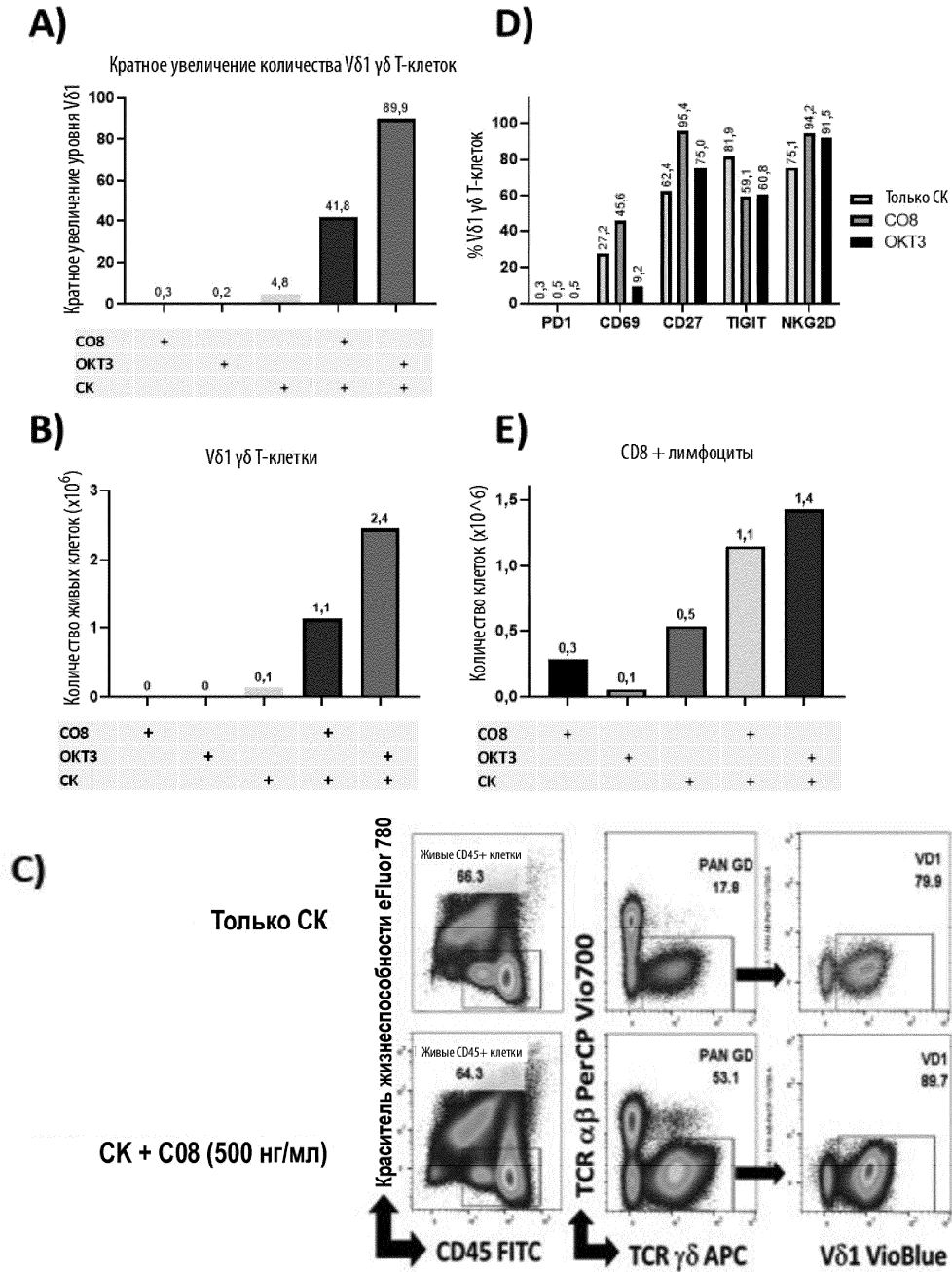
Фиг. 22



Фиг. 23

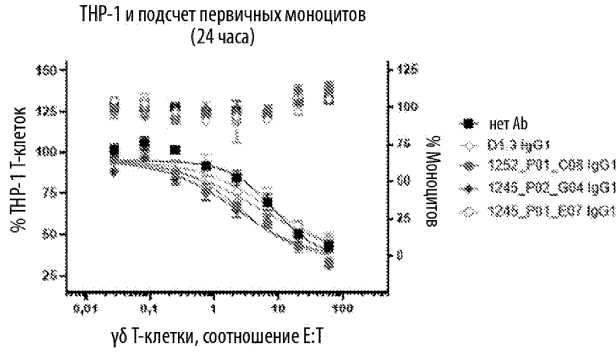


Фиг. 24



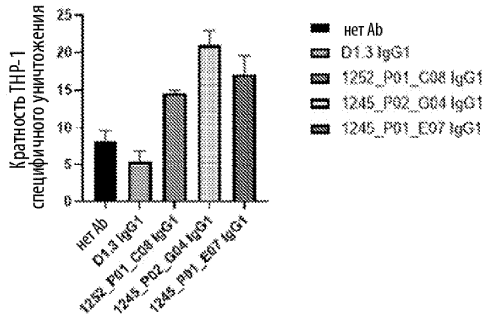
Фиг. 25

A)

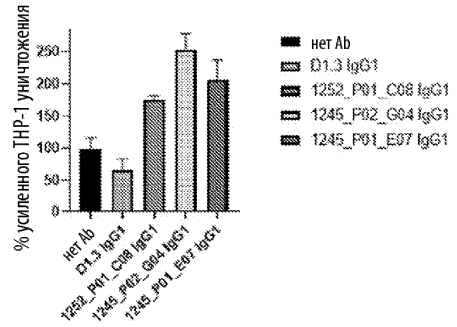


B)

Кратность ТНР-1 против уничтожения моноцитов



% усиления специфического уничтожения болезнетворных клеток



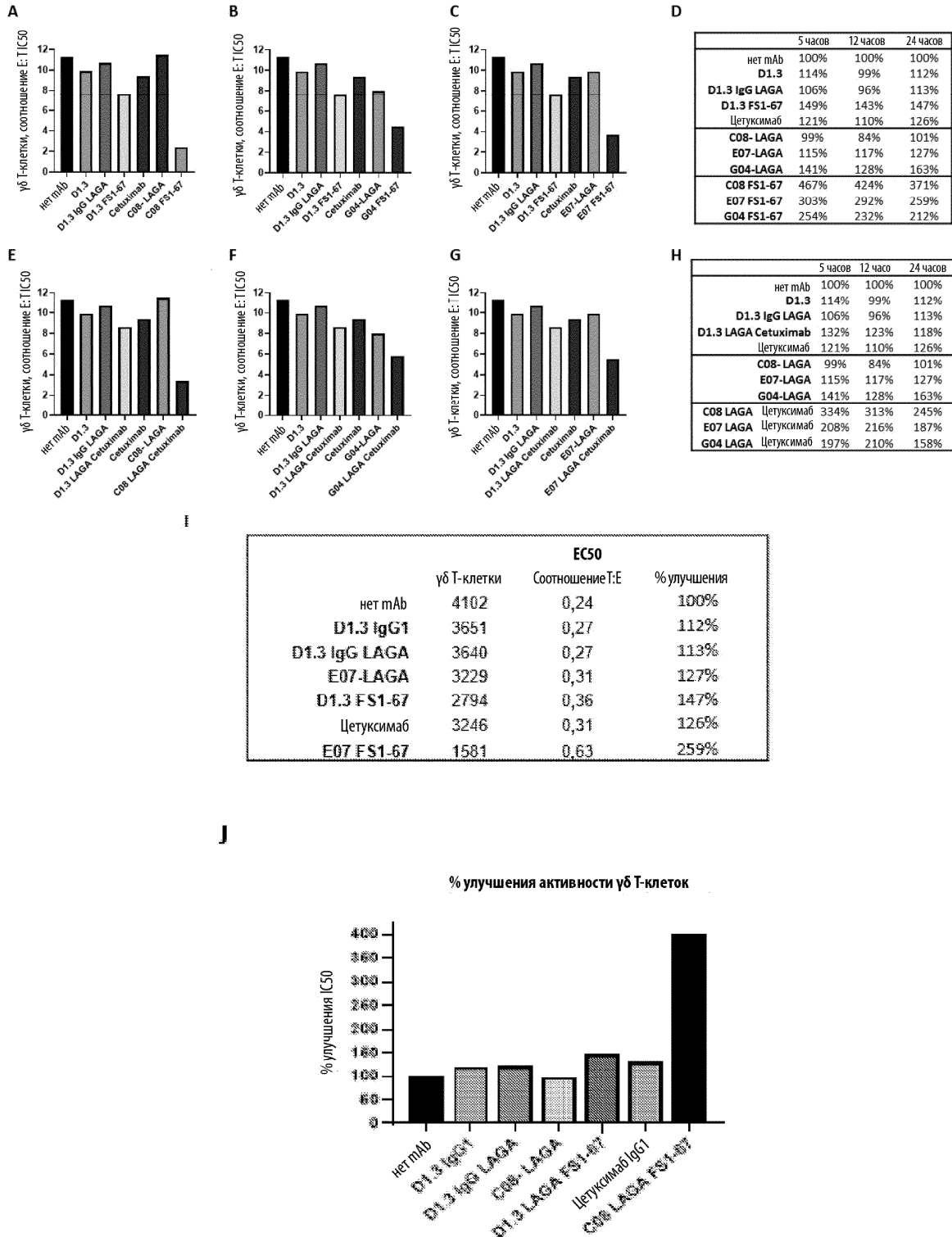
C)

	% улучшения EC50
нет mAb	100%
D1.3 IgG1	109%
1252_P01_C08 IgG1	337%
1245_P02_G04 IgG	383%
1245_P01_E07 IgG	159%

D)

	EC50s	
	уБ Т-клетки	Соотношение T:E
нет mAb	8729	0,11
D1.3 IgG1	8019	0,12
1252_P01_C08 IgG1	2594	0,39
1245_P02_G04 IgG	2278	0,44
1245_P01_E07 IgG	5485	0,18

Фиг. 26

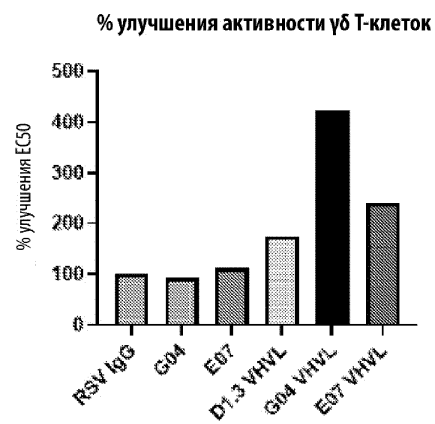


Фиг. 27

A)

	EC50		
	γδ Т-клетки	Соотношение TE	% улучшения
RSV IgG	1988	1,99	100%
G04	2128	2,13	93%
E07	1775	1,78	112%
D1.3 VHVL	1143	1,14	174%
G04 VHVL	470	0,47	423%
E07 VHVL	828	0,83	240%

B)



Фиг. 28



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2