

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491316** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.07.22

(22) Дата подачи заявки
2022.11.23

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(54) **УЛУЧШЕННЫЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ РЕЦЕПТОРЫ**

(31) 21210364.2

(32) 2021.11.25

(33) EP

(86) PCT/EP2022/082898

(87) WO 2023/094413 2023.06.01

(71) Заявитель:
Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Чнь Гочжи, Даровски Дайана (CN),
Фраймозер-Грундшобер Анне, Кляйн
Кристиан, Мёсснер Эккехард (CH),
Вэй Хуафэн, Сюй Вэй, Сюй Дань (CN)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение в целом относится к гуманизированным антигенсвязывающим рецепторам, способным специфически связываться с Fc-доменом, содержащим аминокислотную мутацию R329G в соответствии с нумерацией EU. Настоящее изобретение также относится к Т-клеткам, трансдуцированным антигенсвязывающим рецептором, который рекрутируется путем специфического связывания/взаимодействия с мутантным Fc-доменом терапевтических антител.

202491316
A1

202491316
A1

УЛУЧШЕННЫЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ РЕЦЕПТОРЫ

5

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение в целом относится к гуманизированным антигенсвязывающим рецепторам, способным специфически связываться с Fc-доменом, содержащим аминокислотную мутацию R329G в соответствии с нумерацией EU. Настоящее изобретение также относится к Т-клеткам, трансдуцированным антигенсвязывающим рецептором, который рекрутируется путем специфического связывания/взаимодействия с мутантным Fc-доменом терапевтических антител.

10

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15

20

25

Адаптивная Т-клеточная терапия (АСТ) представляет собой мощный подход к лечению с использованием специфичных в отношении рака Т-клеток (Rosenberg and Restifo, Science 348(6230) (2015), 62-68). В АСТ могут использоваться встречающиеся в природе опухолеспецифические клетки или Т-клетки, которые становятся специфичными с помощью генной инженерии с использованием Т-клеток или химерных антигенных рецепторов (Rosenberg and Restifo, Science 348(6230) (2015), 62-68). АСТ может успешно лечить и индуцировать ремиссию у пациентов, страдающих даже запущенными или не поддающимися лечению заболеваниями, такими как острый лимфатический лейкоз, неходжкинская лимфома или меланома (Dudley et al., J Clin Oncol 26(32) (2008), 5233-5239; Grupp et al., N Engl J Med 368 (16) (2013), 1509-1518; Kochenderfer et al., J Clin Oncol. (2015) 33(6):540-549, doi: 10.1200/JCO.2014.56.2025. Epub 2014 Aug 25).

30

Однако, несмотря на впечатляющую клиническую эффективность, АСТ ограничена токсичностью, связанной с лечением. Специфичность и, как следствие, направленные и ненаправленные эффекты сконструированных Т-клеток, используемых в АСТ, в основном обусловлены антигенсвязывающим фрагментом, нацеленным на опухоль, внедренным в антигенсвязывающие рецепторы. Неограниченная экспрессия опухолевого антигена или временная

разница в уровне экспрессии могут привести к серьезным побочным эффектам или даже прерыванию АСТ из-за непереносимой токсичности лечения.

Кроме того, доступность опухолеспецифических Т-клеток для эффективного лизиса опухолевых клеток зависит от долгосрочной выживаемости и способности к пролиферации сконструированных Т-клеток *in vivo*. С другой стороны, выживание и пролиферация Т-клеток *in vivo* также могут приводить к нежелательным долгосрочным последствиям из-за сохранения неконтролируемого ответа Т-клеток, что может привести к повреждению здоровых тканей (Grupp et al. 2013 N Engl J Med 368(16):1509-18, Maude et al. 2014 N Engl J Med 371(16):1507-17).

Одним из подходов к ограничению серьезной токсичности, связанной с лечением, и повышению безопасности АСТ является ограничение активации и пролиферации Т-клеток путем введения адаптерных молекул в иммунологический синапс. Такие адаптерные молекулы содержат небольшие молекулярные бимодульные переключатели, такие как, например, недавно описанный переключатель фолат-FITC (Kim et al. J Am Chem Soc 2015; 137:2832-2835). Дальнейший подход включал искусственно модифицированные антитела, содержащие метку, которая управляет и направляет специфичность Т-клеток к опухолевым клеткам-мишеням (Ma et al. PNAS 2016; 113(4):E450-458, Cao et al. Angew Chem 2016; 128:1-6, Rogers et al. PNAS 2016; 113(4):E459-468, Tamada et al. Clin Cancer Res 2012; 18(23):6436-6445).

Однако существующие подходы имеют ряд ограничений. Иммунологические синапсы, основанные на молекулярных переключателях, требуют введения дополнительных элементов, которые могут вызвать иммунный ответ или привести к неспецифическим ненаправленным эффектам. Кроме того, сложность таких многокомпонентных систем может ограничивать эффективность и переносимость лечения. С другой стороны, введение структуры метки в существующие терапевтические моноклональные антитела может повлиять на профиль эффективности и безопасности этих конструкторов. К тому же добавление меток требует дополнительных шагов модификации и очистки, что усложняет получение таких антител и к тому же требует дополнительных испытаний на безопасность.

Кроме того, использование *in vivo* нечеловеческих или частично человеческих антител может привести к образованию антител к лекарственному

препарату (ADA), включая антиидиотипические или человеческие антимышинные антитела (НАМА) (Blanco et al. Clin Immunol 17, 96–106 (1997)). Эти ADA могут влиять на фармакокинетические свойства, безопасность и функциональность вводимых антител, и для решения этой проблемы была применена гуманизация (Carter et al. PNAS 89, 4285-4289 (1992)). Точно так же ADA наблюдались для мышиных CAR-T-клеток: Хотя известно, что человеческие антитела к IgG мыши вырабатываются с CAR-трансдуцированными Т-клетками, считается, что они не имеют неблагоприятных клинических последствий. Maus и соавт. впервые описали анафилаксию, возникающую в результате воздействия CAR-модифицированных Т-клеток, скорее всего, из-за IgE-антител, специфичных к CAR. Эти результаты показывают, что потенциальная иммуногенность антигенсвязывающих рецепторов, полученных из мышиных антител, может быть проблемой безопасности, особенно при введении с использованием прерывистой схемы дозирования (Maus et al. Cancer Immunol Res 1, 26-31 (2013)). Соответственно, таргетная терапия опухоли, в частности адаптивная Т-клеточная терапия, нуждается в улучшении, чтобы удовлетворить потребности пациентов с раком. Таким образом, по-прежнему существует потребность в улучшенных средствах, способных повысить безопасность и эффективность АСТ и устранить вышеуказанные недостатки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены антигенсвязывающие рецепторы с улучшенными свойствами, в частности, гуманизированные антигенсвязывающие рецепторы, которые являются стабильными и высоко экспрессированными в трансдуцированных клетках.

В данном документе предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:129. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:129.

В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, которая является

по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:132. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:132. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:132.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

В одном варианте осуществления предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий рецептор, описанный выше в данном документе.

В одном варианте осуществления выделенный полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:130.

В одном варианте осуществления выделенный полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 133.

В одном варианте осуществления предложен полипептид, кодируемый выделенным полинуклеотидом, описанный выше в данном документе.

В одном варианте осуществления предложен вектор, в частности вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, описанный выше в данном документе.

В одном варианте осуществления предложена трансдуцированная Т-клетка, содержащая полинуклеотид или вектор, описанные выше в данном документе.

В одном варианте осуществления предложена трансдуцированная Т-клетка, способная экспрессировать антигенсвязывающий рецептор, описанный выше в данном документе.

В одном варианте осуществления предложен набор, содержащий:

(А) трансдуцированную Т-клетку, способную экспрессировать антигенсвязывающий рецептор, описанный выше в данном документе; и

(В) антитело, которое связывается с антигеном клетки-мишени, и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

В одном варианте осуществления предложен набор, содержащий:

(А) выделенный полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий рецептор, описанный выше в данном документе; и

(B) антитело, которое связывается с антигеном клетки-мишени, и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

В одном варианте осуществления предложен набор, содержащий:

5 (A) выделенный полинуклеотид или вектор, описанный выше в данном документе; и

(B) антитело, которое связывается с антигеном клетки-мишени, и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

10 В одном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1 или IgG4, в частности, Fc-домен IgG1 человека.

В одном варианте осуществления антиген клетки-мишени выбран из группы, состоящей из белка активации фибробластов (FAP), карциноэмбрионального антигена (CEA), мезотелина (MSLN), CD20, фолатного рецептора 1 (FOLR1) и тенасцина (TNC).

В одном варианте осуществления предложен набор, описанный выше в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства.

В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий рецептор или трансдуцированная Т-клетка, описанные выше в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства, причем трансдуцированную Т-клетку, экспрессирующую антигенсвязывающий рецептор вводят до, одновременно с или после введения антитела, которое связывается с антигеном клетки-мишени, в частности, антигеном раковой клетки, и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

В одном варианте осуществления предложен набор, описанный выше в данном документе, для применения в лечении заболевания, в частности, для применения в лечении рака.

В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий рецептор или трансдуцированная Т-клетка, описанные выше в данном документе, для применения в лечении рака, причем лечение включает введение трансдуцированной Т-клетки, экспрессирующей антигенсвязывающий рецептор до, одновременно с или после введения антитела, которое связывается с

антигеном раковой клетки и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

5 В одном варианте осуществления указанный рак выбран из рака эпителиального, эндотелиального или мезотелиального происхождения и рака крови.

В одном варианте осуществления раковый антиген выбран из группы, состоящей из белка активации фибробластов (FAP), карциноэмбрионального антигена (CEA), мезотелина (MSLN), CD20, фолатного рецептора 1 (FOLR1) и тенасцина (TNC).

10 В одном варианте осуществления трансдуцированная Т-клетка получена из клетки, выделенной от субъекта, подлежащего лечению.

В одном варианте осуществления трансдуцированная Т-клетка не получена из клетки, выделенной от субъекта, подлежащего лечению.

15 В одном варианте осуществления предложен способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту трансдуцированной Т-клетки, способной экспрессировать антигенсвязывающий рецептор, описанный выше в данном документе, и введение до, одновременно с или после введения трансдуцированной Т-клетки терапевтически эффективного количества антитела, которое связывается с антигеном клетки-мишени и которое содержит
20 Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает выделение Т-клетки от субъекта и получение трансдуцированной Т-клетки путем трансдукции выделенной Т-клетки полинуклеотидом или вектором,
25 описанными выше в данном документе.

В одном варианте осуществления Т-клетку трансдуцируют ретровирусным или лентивирусным векторным конструктом или невирусным векторным конструктом.

30 В одном варианте осуществления трансдуцированную Т-клетку вводят субъекту путем внутривенной инфузии.

В одном варианте осуществления трансдуцированную Т-клетку приводят в контакт антителами к CD3 и/или к CD28 перед введением субъекту.

В одном варианте осуществления трансдуцированную Т-клетку приводят в контакт по меньшей мере с одним цитокином перед введением субъекту,

предпочтительно интерлейкином-2 (IL-2), интерлейкином-7 (IL-7), интерлейкином-15 (IL-15) и/или интерлейкином-21 или их вариантами.

В одном варианте осуществления заболевание представляет собой рак.

5 В одном варианте осуществления рак выбран из рака эпителиального, эндотелиального или мезотелиального происхождения и рака крови.

В одном варианте осуществления предложен способ индукции лизиса клетки-мишени, включающий приведение в контакт клетки-мишени с трансдуцированной Т-клеткой, способной экспрессировать антигенсвязывающий рецептор, описанный выше в данном документе, в присутствии антитела, 10 которое связывается с антигеном клетки-мишени и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

В одном варианте осуществления клетка-мишень представляет собой раковую клетку.

В одном варианте осуществления клетка-мишень, экспрессирующая 15 антиген, выбрана из группы, состоящей из белка активации фибробластов (FAP), карциноэмбрионального антигена (CEA), мезотелина (MSLN), CD20, фолатного рецептора 1 (FOLR1) и тенасцина (TNC).

В одном варианте осуществления предложено применение антигенсвязывающего рецептора, полинуклеотида или трансдуцированной Т-клетки, описанных выше в данном документе, в производстве лекарственного 20 средства.

В одном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для лечения рака.

В одном варианте осуществления указанный рак выбран из рака 25 эпителиального, эндотелиального или мезотелиального происхождения и рака крови.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГУРА 1. Схематическое изображение химерного антигенсвязывающего рецептора второго поколения со связывающим P329G фрагментом в формате scFv. В ориентации VH x VL scFv (Фиг. 1A) и ориентации VL x VH (Фиг. 1B). На Фиг. 1C и 1D показаны конструкции ДНК, кодирующие антигенсвязывающие рецепторы, изображенные на Фиг. 1A и 1B, соответственно. 30

ФИГУРА 2. Изображена поверхностная экспрессия CAR различных гуманизированных вариантов scFv (Фиг. 2А) и коррелирующая экспрессия GFP, служащая контролем трансдукции (Фиг. 2В).

ФИГУРА 3. Оценка неспецифической передачи сигналов репортерных Т-клеток Jurkat, несущих CAR к P329G, с использованием различных гуманизированных версий связующего P329G фрагмента в качестве связующего фрагмента. Активацию оценивали путем количественного определения интенсивности передачи сигнала CD3 вниз по течению с использованием репортерного анализа клеток Jurkat-NFAT, несущих CAR к P329G, либо в присутствии антител, обладающих различными Fc-вариантами, либо Fc-вариантами P329G, но без клеток-мишеней. Изображены технические средние значения на основании трех повторностей, планки погрешностей указывают СО.

ФИГУРА 4. Активация репортерных Т-клеток Jurkat, несущих CAR к P329G, с использованием различных гуманизированных версий связующего P329G фрагмента в присутствии клеток-мишеней FolR1⁺ с высоким (HeLa-FolR1), средним (Skov3) и низким (HT29) уровнем целевой экспрессии в комбинации с антителами, которые обладают высоким уровнем аффинности (16D5), средним уровнем аффинности (16D5 W96Y) или низким уровнем аффинности (16D5 G49S/K53A) к FolR1. Активацию оценивали путем количественной оценки интенсивности передачи сигналов CD3 вниз по течению с использованием анализа репортерных клеток Jurkat-NFAT, несущих CAR к P329G. Изображены технические средние значения на основании трех повторностей, планки погрешностей указывают СО.

ФИГУРА 5. Активация репортерных Т-клеток Jurkat NFAT, несущих CAR к P329G, с использованием различных гуманизированных версий связующего P329G фрагмента в качестве связующего фрагмента. Активность репортерных клеток оценивали в присутствии нацеливающего антитела IgG1 к FolR1 (16D5) P329G и клеток-мишеней HeLa (FolR1⁺) (Фиг. 5А). Дозозависимую активацию антител оценивали путем количественного определения интенсивности передачи сигналов CD3 вниз по течению с использованием анализа репортерных клеток Jurkat-NFAT, несущих CAR к P329G, и рассчитывали площадь под кривой (Фиг. 5В). Изображены технические средние значения на основании трех повторностей, планки погрешностей указывают СО.

ФИГУРА 6. Активация репортерных Т-клеток Jurkat NFAT, несущих CAR к P329G, с использованием различных гуманизированных версий связующего P329G фрагмента в качестве связующего фрагмента. Активность репортерных клеток оценивали в присутствии нацеливающего антитела IgG1 к HER2 (пертузумаб) P329G и клеток-мишеней HeLa (HER2⁺) (Фиг. 6А). Дозозависимую активацию антител оценивали путем количественного определения интенсивности передачи сигналов CD3 вниз по течению с использованием анализа репортерных клеток Jurkat-NFAT, несущих CAR к P329G, и рассчитывали площадь под кривой (Фиг. 6В). Изображены технические средние значения на основании трех повторностей, планки погрешностей указывают СО.

ФИГУРА 7. Изображена поверхностная экспрессия CAR варианта VHxVL1 scFv, стабилизированного дисульфидом.

ФИГУРА 8. Схематическое изображение конструктора CAR HuR968B и HuR9684M. Для конструктора HuR9684M с использованием IgG4M-CD28TM-CD28CSD-CD3z, а для HuR968B G4S-CD8TM-4-1BBCSD-CD3z.

ФИГУРА 9. Изображена экспрессия HuR968B и HuR9684M в клетках HEK293T, обнаруженная с помощью проточной цитометрии.

ФИГУРА 10. Репрезентативные данные проточной цитометрии, показывающие экспрессию соответствующих конструкторов PG CAR HuR968B и HuR9684M (Фиг. 9А) и нетрансдуцированного контроля (Фиг. 9А). Общая экспрессия CAR колеблется от 18% до 36%.

ФИГУРА 11. Продемонстрирован эффект уничтожения PG CAR с использованием конструкторов HuR968B, HuR9684M и обычных клеток 8E5 CAR-T, измеренный с помощью xCELLigence. В качестве клеток-мишеней использовали Claudine 18.2, экспрессирующие опухолевые клетки DAN-G18.2, и тестировали их с донорскими (PCH20201100004) Т-клетками, экспрессирующими HuR9684M или HuR968B PG CAR. При соотношении Э:М 1:2 и концентрации IgG 100 нг/мл использовали антитело P329G Claudin 18.2 A6.

ФИГУРА 12. Доказывается эффект уничтожения клеток HuR968B CAR-T в сочетании с различными концентрациями А6 или Zmab PG IgG, измеренный по высвобождению ЛДГ. DAN-G18.2, экспрессирующий CLDN18.2, использовали в качестве клеток-мишеней, а CAR-T-клетки HuR968B использовали в качестве эффекторных клеток.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

В настоящем документе термины используют так, как это общепринято в данной области техники, если ниже не приведено иное определение.

В целях данного документа «акцепторная каркасная область человека» представляет собой каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области переменного домена легкой цепи (VL) или каркасной области переменного домена тяжелой цепи (VH), полученную из каркасной области человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной области, как определено ниже. Человеческая акцепторная каркасная область, «полученная из» каркасной области человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной области, может содержать такую же аминокислотную последовательность или может содержать изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых аспектах число аминокислотных изменений составляет 10 или меньше, 9 или меньше, 8 или меньше, 7 или меньше, 6 или меньше, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше или 2 или меньше. В некоторых аспектах человеческая акцепторная каркасная область VL идентична по последовательности с последовательностью каркасной области VL человеческого иммуноглобулина или последовательностью человеческой консенсусной каркасной области.

«Активирующий Fc-рецептор» представляет собой Fc-рецептор, который после взаимодействия с Fc-доменом антитела вызывает события передачи сигналов, которые стимулируют несущую рецептор клетку осуществлять эффекторные функции. Человеческие активирующие Fc-рецепторы включают Fc γ RIIIa (CD16a), Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32) и Fc α RI (CD89).

«Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность» («АЗКЦ») представляет собой иммунный механизм, приводящий к лизису покрытых антителом клеток-мишеней иммунными эффекторными клетками. Клетки-мишени представляют собой клетки, с которыми специфически связываются антитела или их производные, содержащие Fc-область, в общем случае посредством белковой части, N-концевой относительно Fc-области. Используемый в данном документе термин «уменьшенная АЗКЦ» определяется как уменьшение числа клеток-мишеней, лизированных за заданное время при заданной концентрации антитела в среде, окружающей клетки-мишени,

посредством определенного выше механизма АЗКЦ, и/или как повышение концентрации антитела в среде, окружающей клетки-мишени, необходимое для обеспечения лизиса заданного числа клеток-мишеней за заданное время посредством механизма АЗКЦ. Снижение АЗКЦ определяется относительно АЗКЦ, опосредованной таким же антителом, вырабатываемым таким же типом клеток-хозяев, с использованием таких же стандартных способов получения, очистки, составления и хранения (которые хорошо известны специалистам в данной области техники), но которое не было сконструировано. Например, уменьшение АЗКЦ, опосредованное антителом, содержащим в Fc-домене аминокислотную замену, которая уменьшает АЗКЦ, определяется относительно АЗКЦ, опосредованной таким же антителом без аминокислотной замены в Fc-домене. Подходящие анализы для измерения АЗКЦ хорошо известны в данной области техники (смотрите, например, публикацию РСТ № WO 2006/082515 или публикацию РСТ № WO 2012/130831).

«Эффективное количество» средства, например, фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желательного терапевтического или профилактического результата.

Термин «аффинность» относится к силе суммарных общих нековалентных взаимодействий между одиночным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнера по связыванию (например, антигена). Если не указано иное, используемый в данном документе термин «аффинность связывания» относится к присущей молекуле аффинности связывания, отражающей взаимодействие между членами пары связывающихся компонентов (например, антителом и антигеном) при их соотношении 1:1. Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_d). Аффинность можно измерять с помощью общепринятых методов, известных в данной области техники, включая описанные в данном документе. Конкретные иллюстративные и типовые способы для определения аффинности связывания описаны ниже.

Термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты являются

аминокислотами, закодированными генетическим кодом, а также теми аминокислотами, которые впоследствии были модифицированы, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют ту же основную химическую структуру, что и встречающиеся в природе аминокислоты, то есть α -углерод, связанный с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу и группу R, например, гомосерин, норлейцин, метионин сульфоксид, метионин метилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота. Аминокислотные миметики относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но функционируют аналогично встречающейся в природе аминокислоте. Аминокислоты могут обозначаться в данном документе либо их общеизвестными трехбуквенными обозначениями, либо однобуквенными обозначениями, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Подразумевается, что используемый в данном документе термин «аминокислотная мутация» включает аминокислотные замены, делеции, вставки и модификации. Можно осуществлять любую комбинацию замены, делеции, вставки и модификации, чтобы получить конечный конструктор, при условии, что конечный конструктор обладает необходимыми характеристиками, например, уменьшенным связыванием с Fc-рецептором или повышенной ассоциацией с другим пептидом. Делеции и вставки в аминокислотной последовательности включают амино- и/или карбоксиконцевые делеции и вставки аминокислот. Конкретными аминокислотными мутациями являются аминокислотные замены. В целях изменения, например, характеристик связывания Fc-области, в особенности предпочтительными являются неконсервативные аминокислотные замены, т.е. замещение одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей отличные структурные и/или химические свойства. Аминокислотные замены включают замещение не встречающимися в природе аминокислотами или встречающимися в природе аминокислотными производными двадцати стандартных аминокислот (например, 4-гидроксипролином, 3-метилгистидином, орнитинном, гомосерином, 5-гидроксилизином). Аминокислотные мутации можно

создавать, используя хорошо известные в данной области техники генетические или химические способы. Генетические способы могут включать сайт-направленный мутагенез, ПЦР, генный синтез и т.п. Подразумевается, что также могут быть применимы способы изменений групп боковых цепей аминокислот способами, отличными от генной инженерии, такими как химическая модификация. Для указания одной и той же аминокислотной мутации в данном документе можно использовать различные обозначения. Например, замена пролина в положении 329 Fc-домена на глицин может быть обозначена как 329G, G329, P329G или Pro329Gly.

10 Термин «антитело» в данном документе используется в самом широком смысле и включает различные структуры антител, включая без ограничения моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют необходимую антигенсвязывающую активность.

15 «Фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают без ограничения Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv и scFab); однодоменные антитела (dAb); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Обзор некоторых фрагментов антител см. в Holliger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136 (2005).

20 Термин «антигенсвязывающий домен» относится к части антитела, которая содержит участок, специфически связывающийся и комплементарный с частью антигена или со всем антигеном. Антигенсвязывающий домен может быть образован, например, одним или более переменными доменами антитела (также называемыми переменными областями антитела). В частности, антигенсвязывающий домен содержит переменный домен легкой цепи антитела (VL) и переменный домен тяжелой цепи антитела (VH).

30 Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающая молекула» относится в самом широком смысле к молекуле, которая специфически связывает антигенную детерминанту. Примерами антигенсвязывающих молекул являются иммуноглобулины и производные,

например, их фрагменты, а также их антигенсвязывающие рецепторы и производные.

Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидной молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент способен направлять соединение, к которому он присоединен (например, клетке, экспрессирующей антигенсвязывающий рецептор, содержащий антигенсвязывающий фрагмент) к целевому сайту, например, к конкретному типу опухолевой клетки или опухолевой стромы, несущей антигенную детерминанту. Антигенсвязывающие фрагменты включают антитела и их фрагменты, которые дополнительно определены в данном документе. Конкретные антигенсвязывающие фрагменты включают антигенсвязывающий домен антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела (например, scFv-фрагмент). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие фрагменты могут содержать константные области антитела, как дополнительно определено в данном документе и известно в данной области техники. Применимые константные области тяжелой цепи включают любой из пяти изотипов: α , δ , ϵ , γ или μ . Применимые константные области легкой цепи включают любой из двух изотипов: κ и λ .

В контексте настоящего изобретения термин «антигенсвязывающий рецептор» относится к антигенсвязывающей молекуле, содержащей якорный трансмембранный домен и внеклеточный домен, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент. Антигенсвязывающий рецептор может быть получен из частей полипептида из разных источников. Соответственно, его также можно понимать, как «слитый белок» и/или «химерный белок». Обычно слитые белки представляют собой белки, созданные путем соединения двух или более генов (или предпочтительно кДНК), которые изначально кодировали отдельные белки. Трансляция этого слитого гена (или слитой кДНК) приводит к получению одного полипептида, предпочтительно с функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных белков. Рекомбинантные слитые белки создаются искусственно с помощью технологии рекомбинантной ДНК для использования в биологических исследованиях или терапии. Дополнительные подробности об антигенсвязывающих рецепторах по

настоящему изобретению описаны ниже. В контексте настоящего изобретения CAR (химерный антигенный рецептор) понимается как антигенсвязывающий рецептор, содержащий внеклеточную часть, содержащую антигенсвязывающий фрагмент, слитый спейсерной последовательностью с якорным трансмембранным доменом, который сам слит с внутриклеточными сигнальными доменами.

«Антигенсвязывающий сайт» относится к сайту, т.е. одному или более аминокислотным остаткам антигенсвязывающей молекулы, который обеспечивает взаимодействие с антигеном. Например, антигенсвязывающий сайт антитела содержит аминокислотные остатки из определяющих комплементарность областей (CDR). Нативная молекула иммуноглобулина, как правило, имеет два антигенсвязывающих сайта, молекула Fab, как правило, имеет один антигенсвязывающий сайт.

Термин «антигенсвязывающий домен» относится к части антигена или антигенсвязывающего рецептора, которая содержит участок, который специфически связывается и является комплементарным с частью или со всем антигеном. Антигенсвязывающий домен можно обеспечить, например, одним или более переменными доменами иммуноглобулина (также называемыми переменными областями). В частности, антигенсвязывающий домен содержит переменный домен легкой цепи иммуноглобулина (VL) и переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина (VH).

Используемый в данном документе термин «антигенная детерминанта» является синонимом с терминами «антиген» и «эпитоп» и относится к сайту (например, непрерывному участку из аминокислот или конформационной конфигурации, состоящей из разных областей из не являющихся непрерывными аминокислот) на полипептидной макромолекуле, с которым связывается антигенсвязывающий фрагмент с образованием комплекса антигенсвязывающий фрагмент-антиген. Применимые антигенные детерминанты можно обнаружить, например, на поверхностях опухолевых клеток, на поверхностях инфицированных вирусом клеток, на поверхностях других пораженных заболеванием клеток, на поверхности иммунных клеток, в свободном виде в сыворотке крови и/или во внеклеточном матриксе (ВКМ). Белки, применимые в качестве антигенов в данном документе, могут представлять собой любую нативную форму белков из любого источника, относящегося к позвоночным,

включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. В конкретном варианте осуществления антиген представляет собой человеческий белок. Когда в данном документе приводится ссылка на конкретный белок, этот термин включает

5 «полноразмерный» непротессированный белок, а также любую форму белка, которая является результатом процессинга в клетке. Этот термин также охватывает варианты белка природного происхождения, например, сплайс-варианты или аллельные варианты.

«Антитела, содержащие мутантный Fc-домен» согласно настоящему изобретению, т.е. терапевтические антитела, могут иметь один, два, три или более связывающих доменов и могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Антитела могут быть полноразмерными из одного вида или могут быть химеризированными или гуманизированными. Для антитела с более чем двумя антигенсвязывающими

10 доменами некоторые связывающие домены могут быть идентичными и/или иметь одинаковую специфичность.

Используемый в данном документе термин «АТМ» относится к «якорному трансмембранному домену», который определяет участок полипептида, способный интегрироваться в клеточную(ые) мембрану(ы) клетки. АТМ может

20 быть слит с внеклеточными и/или внутриклеточными полипептидными доменами, причем эти внеклеточные и/или внутриклеточные полипептидные домены будут ограничены клеточной мембраной. В контексте антигенсвязывающих рецепторов по настоящему изобретению АТМ обеспечивает прикрепление к мембране и удержание антигенсвязывающего

25 рецептора по настоящему изобретению. Антигенсвязывающие рецепторы по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один АТМ и внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий фрагмент. Кроме того, АТМ может быть слит с внутриклеточными сигнальными доменами.

Под термином «специфическое связывание» подразумевается, что связывание является селективным в отношении антигена и может быть отделено

30 от нежелательных или неспецифических взаимодействий. Способность антигенсвязывающего фрагмента связываться с конкретной антигенной детерминантой можно измерить либо с помощью ферментного иммуносорбентного анализа (ИФА), либо других методик, известных

специалисту в данной области техники, например, методики поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (с анализом на приборе BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), и традиционных анализов связывания (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). В одном варианте осуществления степень связывания антигенсвязывающего фрагмента с неродственным белком составляет менее чем приблизительно 10% связывания антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, как измерено, например, с помощью ППР. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с антигеном, или антигенсвязывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий фрагмент, имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или меньше, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

Используемый в данном документе термин «CDR» относится к «определяющей комплементарности области», который хорошо известен в данной области техники. CDR представляют собой части иммуноглобулинов или антигенсвязывающих рецепторов, которые определяют специфичность указанных молекул и вступают в контакт со специфическим лигандом. CDR представляют собой наиболее переменную часть молекулы и вносят вклад в антигенсвязывающее разнообразие этих молекул. В каждом V-домеене есть три области CDR CDR1, CDR2 и CDR3. CDR-H представляет собой область CDR переменной области тяжелой цепи, а CDR-L относится к области CDR переменной области легкой цепи. Под VH подразумевается переменная область тяжелой цепи, а под VL подразумевается переменная область легкой цепи. Области CDR в области, происходящей из Ig, можно определить, как описано у «Кабат» («Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th edit. NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services (1991); Chothia J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) или «Хотиа» (Nature 342 (1989), 877-883).

Термин «CD3z» относится к дзета-цепи гликопротеина поверхности T-клеток CD3, также известной как «дзета-цепь рецептора T3 T-клеток» и «CD247».

Термин «химерный антигенный рецептор» или «химерный рецептор» или «CAR» относится к антигенсвязывающему рецептору, состоящему из

внеклеточной части антигенсвязывающего фрагмента (например, одноцепочечного домена антитела), слитого спейсерной последовательностью с внутриклеточными сигнальными/косигнальными доменами (такими как, например, CD3z и CD28).

5 «Класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, которые содержит его тяжелая цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно поделить на подклассы (изоотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. В определенных аспектах антитело относится к изоотипу IgG₁.
10 В определенных аспектах антитело относится к изоотипу IgG₁ с мутациями R329G, L234A и L235A для снижения эффекторной функции Fc-области. В других аспектах антитело относится к изоотипу IgG₂. В определенных аспектах антитело относится к изоотипу IgG₄ с мутацией S228P в шарнирной области для улучшения стабильности антитела IgG₄. Константные домены тяжелой цепи, соответствующие разным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Легкая цепь антитела может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности ее константного домена.

20 Термин «константная область человеческого происхождения» при использовании в настоящей заявке означает константную область тяжелой цепи человеческого антитела подкласса IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄ и/или константную область каппа или лямбда легкой цепи. Такие константные области можно использовать в человеческих или гуманизированных антителах, и они хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в Kabat, E.A., et al.
25 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) (смотрите также, например, Johnson, G., and Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788). Если в данном документе не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в константной области
30 соответствует системе нумерации EU, также называемой EU-индексом по Кабату, как это описано в Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

Под «кроссоверной» молекулой Fab (также называемой «Crossfab») подразумевается молекула Fab, в которой обменены (т.е. заменены друг другом) переменные домены тяжелой и легкой цепи Fab, т.е. кроссоверная молекула Fab содержит пептидную цепь, состоящую из переменного домена легкой цепи VL и константного домена тяжелой цепи 1 CH1 (VL-CH1, в направлении от N- к C-концу), и пептидную цепь, состоящую из переменного домена тяжелой цепи VH и константного домена легкой цепи CL (VH-CL, в направлении от N- к C-концу). Для ясности, в кроссоверной молекуле Fab, в которой обменены переменные домены легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab, пептидная цепь, содержащая константный домен тяжелой цепи 1 CH1, называется в данном документе «тяжелой цепью» кроссоверной молекулы Fab.

Используемый в данном документе термин «CSD» относится к костимулирующему сигнальному домену.

«Эффекторные функции» относятся к видам биологической активности, характерным для Fc-области антитела, которые варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ); связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; уменьшающее регуляцию клеточных поверхностных рецепторов (например, В-клеточного рецептора) и активацию В-клетки.

Как используется в данном документе, считается, что термины «конструировать, сконструированный, конструирование» включают любую манипуляцию с пептидным остовом или посттрансляционные модификации встречающегося в природе или рекомбинантного полипептида или его фрагмента. Конструирование включает модификации аминокислотной последовательности, профиля гликозилирования или групп боковых цепей отдельных аминокислот, а также комбинации этих подходов.

Термин «экспрессионная кассета» относится к полинуклеотиду, созданному рекомбинантным или синтетическим способом, с рядом определенных элементов нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают возможность транскрипции конкретной нуклеиновой кислоты в клетке-мишени. Рекомбинантная экспрессионная кассета может быть включена в плазмиду, хромосому, митохондриальную ДНК, пластидную ДНК, вирус или фрагмент нуклеиновой кислоты. Как правило, рекомбинантная экспрессионная кассета,

как часть экспрессионного вектора, содержит, помимо других последовательностей, последовательность нуклеиновой кислоты, предназначенную для транскрипции, и промотор. В определенных вариантах осуществления экспрессионная кассета по изобретению содержит 5 полинуклеотидные последовательности, которые кодируют биспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению или их фрагменты.

«Молекула Fab» относится к белку, состоящему из домена VH и CH1 тяжелой цепи («тяжелая цепь Fab») и домена VL и CL легкой цепи («легкая цепь Fab») иммуноглобулина.

10 В данном документе термин «Fc-домен» или «Fc-область» используют для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Этот термин включает Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-области. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи IgG могут немного варьироваться, Fc-область 15 тяжелой цепи IgG человека по определению обычно простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксиконца тяжелой цепи. При этом антитела, вырабатываемые клетками-хозяевами, могут подвергаться посттрансляционному расщеплению одной или более, в частности, одной или двух аминокислот из C-конца тяжелой цепи. Следовательно, антитело, вырабатываемое клеткой-хозяином посредством 20 экспрессии конкретной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полноразмерную тяжелую цепь, может содержать полноразмерную тяжелую цепь или может содержать расщепленный вариант полноразмерной тяжелой цепи (что также называется в данном документе «тяжелой цепью с расщепленным вариантом»). Это может быть случаем, когда двумя последними 25 C-концевыми аминокислотами тяжелой цепи являются глицин (G446) и лизин (K447, нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату). Следовательно, C-концевой лизин (Lys447) или C-концевые глицин (Gly446) и лизин (K447) Fc-области могут присутствовать или нет. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей, включая Fc-домены (или субъединицу Fc-домена по 30 определению в данном документе), обозначены в данном документе без C-концевого глицин-лизинового дипептида, если не указано иное. В одном варианте осуществления настоящего изобретения тяжелая цепь, содержащая субъединицу Fc-домена, как указано в данном документе, содержит дополнительный C-концевой глицин-лизиновый дипептид (G446 и K447,

нумерация в соответствии с EU-индексом по Кабату). В одном варианте осуществления настоящего изобретения тяжелая цепь, содержащая субъединицу Fc-домена, как указано в данном документе, содержит дополнительный С-концевой остаток глицина (G446, нумерация в соответствии с EU-индексом по Кабату). Композиции по настоящему изобретению, такие как описанные в данном документе фармацевтические композиции, содержат популяцию антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению. Популяция антигенсвязывающей молекулы может содержать молекулы, имеющие полноразмерную тяжелую цепь, и молекулы, имеющие тяжелую цепь с расщепленным вариантом. Популяция антигенсвязывающих молекул может состоять из смеси молекул, имеющих полноразмерную тяжелую цепь, и молекул, имеющих тяжелую цепь с расщепленным вариантом, причем по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% антигенсвязывающих молекул имеют тяжелую цепь с расщепленным вариантом. В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая популяцию антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, содержит антигенсвязывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь, включая субъединицу Fc-домена, как указано в данном документе, с дополнительным С-концевым глицин-лизиновым дипептидом (G446 и K447, нумерация в соответствии с EU-индексом по Кабату). В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая популяцию антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, содержит иммуноактивирующую молекулу, связывающую Fc-домен, содержащую тяжелую цепь, включая субъединицу Fc-домена, как указано в данном документе, с дополнительным С-концевым остатком лизина (G446, нумерация в соответствии с EU-индексом по Кабату). В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция содержит популяцию антигенсвязывающих молекул, состоящую из молекул, содержащих тяжелую цепь, содержащую субъединицу Fc-домена, как определено в данном документе; молекул, содержащих тяжелую цепь, содержащую субъединицу Fc-домена, как определено в данном документе, с дополнительным С-концевым остатком глицина (G446, нумерация в соответствии с EU-индексом по Кабату); и молекул, содержащих тяжелую цепь, содержащую субъединицу Fc-домена, как определено в данном документе, с дополнительным С-концевым глицин-

лизиновым дипептидом (G446 и K447, нумерация в соответствии с EU-индексом по Кабату). Если в данном документе не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой EU-индексом, как это описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (также см. выше).
Используемый в данном документе термин «субъединица» Fc-домена относится к одному из двух полипептидов, образующих димерный Fc-домен, т. е. полипептиду, содержащему C-концевые константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, способные к стабильной самоассоциации. Например, субъединица Fc-домена IgG содержит константные домены CH2 IgG и CH3 IgG.

«Каркасная область» или «FR» относится к остаткам переменного домена, отличным от определяющих комплементарность областей (CDR). FR переменного домена обычно состоит из четырех FR-доменов: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности CDR и FR обычно находятся в VH (или VL) в следующем порядке: FR1-CDR-H1(CDR-L1)-FR2- CDR-H2(CDR-L2)-FR3- CDR-H3(CDR-L3)-FR4.

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «полное антитело» используются взаимозаменяемо в данном документе для обозначения антитела, имеющего структуру, по сути, сходную со структурой нативного антитела, или имеющего тяжелые цепи, которые содержат Fc-область, как определено в данном документе.

Под «слитым» подразумевается, что компоненты (например, Fab и трансмембранный домен) связаны пептидными связями, как напрямую, так и посредством одного или более пептидных линкеров.

Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была внесена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первично трансформированные клетки и полученное от них потомство вне зависимости от числа пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным исходной клетке по содержанию нуклеиновой кислоты и может содержать мутации. В данный документ включено мутантное потомство, которое имеет такую же функцию или биологическую активность, в отношении

которых проводится скрининг или отбор изначально трансформированных клеток.

«Человеческое антитело» представляет собой антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого человеком или клеткой человека, или полученного из отличного от человеческого источника, в котором используются репертуары человеческих антител или другие последовательности, кодирующие человеческие антитела. Данное определение человеческого антитела явным образом исключает гуманизированное антитело, содержащее отличные от человеческих антигенсвязывающие остатки.

«Человеческая консенсусная каркасная область» представляет собой каркасную область, которая представляет наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в наборе каркасных последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина. Обычно набор последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина получают из подгруппы последовательностей переменных доменов. В общем случае подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу согласно Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. В одном аспекте в случае VL подгруппа представляет собой подгруппу каппа I согласно Kabat et al., *supra*. В одном аспекте в случае VH подгруппа представляет собой подгруппу III согласно Kabat et al., *supra*.

«Гуманизированное» антитело (например, гуманизированный scFv-фрагмент) относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из отличных от человеческих CDR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В определенных аспектах гуманизированное антитело содержит, по сути, все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по сути все CDR соответствуют таковым из отличных от человеческого антитела, а все или по сути все FR соответствуют таковым из человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, полученную из человеческого антитела. «Гуманизированная форма» антитела, например, отличного от человеческого антитела, относится к антителу, подвергнутому гуманизации.

Используемый в данном документе термин «гипервариабельная область» или «HVR» относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности и которые определяют антигенсвязывающую специфичность, например, к «определяющим комплементарность областям» («CDR»).

В общем случае антитела содержат шесть CDR: три в VH (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три в VL (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Типовые CDR по данному документу включают:

(a) гипервариабельные петли, находящиеся в аминокислотных остатках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR, находящиеся в аминокислотных остатках 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.* Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)); и

(c) антигенные контакты, находящиеся в аминокислотных остатках 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)).

Если не указано иное, CDR определены в соответствии с Kabat et al., выше. Специалисту в данной области техники понятно, что отнесение CDR также можно определять в соответствии с Хотиа *supra*, МакКаллум *supra* или любой другой научно принятой системой номенклатуры.

«Иммуноконъюгат» представляет собой антитело, конъюгированное с одной или более гетерологичными молекулами, включая без ограничения цитотоксическое средство.

«Индивидуум» или «субъект» представляет собой млекопитающее. Млекопитающие включают, но не ограничиваются этим, одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и отличных от человека приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В определенных аспектах индивидуум или субъект представляет собой человека.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было отделено от компонента его природного окружения. В некоторых аспектах антитело является очищенным до более чем 95% или 99% чистоты по

определению, например, электрофоретическими (например, ДСН-ПААГ, изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), капиллярный электрофорез) или хроматографическими (например, ионообменная или обращенно-фазовая ВЭЖХ) способами. Обзор методов оценки чистоты антител см., например, в Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Термин «молекула иммуноглобулина» относится к белку, имеющему структуру антитела природного происхождения. Например, иммуноглобулины класса IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой приблизительно 150000 дальтон, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, которые связаны дисульфидными связями. В направлении от N-конца к C-концу каждая тяжелая цепь содержит переменный домен (VH), также называемый переменным доменом тяжелой цепи или переменной областью тяжелой цепи, за которым следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3), также называемых константной областью тяжелой цепи. Аналогично, в направлении от N-конца к C-концу каждая легкая цепь содержит переменный домен (VL), также называемый переменным доменом легкой цепи или переменной областью легкой цепи, за которым следует константный домен легкой цепи (CL), также называемый константной областью легкой цепи. Тяжелая цепь иммуноглобулина может быть отнесена к одному из пяти типов, называемых α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) или μ (IgM), некоторые из которых могут быть дополнительно поделены на подтипы, например, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) и α_2 (IgA₂). Легкая цепь иммуноглобулина может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности ее константного домена. Иммуноглобулин состоит главным образом из двух молекул Fab и домена Fc, связанных посредством шарнирной области иммуноглобулина.

Под «выделенной молекулой нуклеиновой кислоты» или полинуклеотидом подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была удалена из своего нативного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащийся в векторе, считается выделенным в контексте настоящего изобретения. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, находящиеся в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или главным образом) полинуклеотиды в

растворе. Выделенный полинуклеотид включает полинуклеотидную молекулу, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат эту полинуклеотидную молекулу, но в которых полинуклеотидная молекула присутствует
5 внехромосомно или в хромосомном положении, которое отличается от ее природного хромосомного положения. Выделенные молекулы РНК включают *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты по настоящему изобретению, а также положительные и отрицательные формы цепей и двухцепочечные формы. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты, согласно настоящему изобретению, дополнительно включают такие молекулы, полученные
10 синтетически. Дополнительно полинуклеотид или нуклеиновая кислота могут представлять собой или включать регуляторный элемент, такой как промотор, сайт связывания рибосомы или терминатор транскрипции.

Под нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, имеющими нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, например, на 95%
15 «идентичную» эталонной последовательности по настоящему изобретению, подразумевается, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична эталонной последовательности за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать до пяти точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов эталонной нуклеотидной
20 последовательности. Другими словами, чтобы получить полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную эталонной нуклеотидной последовательности, до 5% нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другими нуклеотидами или в эталонную последовательность может быть вставлено число
25 нуклеотидов, составляющее до 5% от общего числа нуклеотидов в эталонной последовательности. Эти изменения эталонной последовательности могут находиться в 5' или 3' концевых положениях эталонной нуклеотидной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, размещаясь по отдельности между остатками в эталонной последовательности
30 или одной или более непрерывными группами в эталонной последовательности. На практике определение того, что любая конкретная полинуклеотидная последовательность является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению, можно осуществлять традиционным способом,

используя известные компьютерные программы, такие как те, которые обсуждаются ниже для полипептидов (например, ALIGN-2).

Под «выделенным» полипептидом, или его вариантом, или производным подразумевается полипептид, который не находится в своем природном окружении. Никакого конкретного требования по уровню очистки не существует. Например, выделенный полипептид может быть удален из его нативного или природного окружения. Рекомбинантно полученные полипептиды или белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей настоящего изобретения, как нативные, так и рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы или частично, или полностью очищены любым подходящим методом.

«Модификация, способствующая ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена» представляет собой манипуляцию с пептидным остовом или посттрансляционные модификации субъединицы Fc-домена, которые уменьшают или предотвращают ассоциацию полипептида, содержащего субъединицу Fc-домена, с идентичным полипептидом с образованием гомодимера. Используемая в данном документе модификация, способствующая ассоциации, в частности, включает отдельные модификации, проведенные в каждой из субъединиц Fc-домена, ассоциация которых необходима (т. е. в первой и второй субъединицах Fc-домена), причем модификации являются комплементарными по отношению друг к другу так, чтобы способствовать ассоциации двух субъединиц Fc-домена. Например, модификация, способствующая ассоциации, может изменять структуру или заряд одной или обеих субъединиц Fc-домена так, чтобы сделать их ассоциацию стерически или электростатически выгодной, соответственно. Таким образом, (гетеро)димеризация происходит между полипептидом, содержащим первую субъединицу Fc-домена, и полипептидом, содержащим вторую субъединицу Fc-домена, которые могут быть неидентичными в том смысле, что дополнительные компоненты, слитые с каждой из субъединиц (например, антигенсвязывающие фрагменты), не являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления модификация, способствующая ассоциации, включает аминокислотную мутацию в Fc-домене, в частности аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления модификация, способствующая ассоциации, включает отдельную аминокислотную мутацию, в частности аминокислотную замену, в каждой из двух субъединиц Fc-домена.

Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции, по существу, гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением
5 возможных вариантных антител, например, содержащих естественные мутации или возникающих при получении препарата моноклональных антител, причем такие варианты в целом присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое
10 моноклональное антитело препарата моноклональных антител направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, определение «моноклональный» указывает на характеристику антитела, как полученного из, по существу, гомогенной популяции антител, и его не следует интерпретировать как требование получения антитела каким-либо конкретным способом.
15 Например, моноклональные антитела в соответствии с настоящим изобретением можно получать с помощью ряда методик, включая без ограничения способ гибридомы, способы рекомбинантных ДНК, способы фагового дисплея и способы с использованием трансгенных животных, содержащих все или часть локусов человеческого иммуноглобулина, при этом такие способы и другие
20 типовые способы получения моноклональных антител описаны в данном документе.

«Голое антитело» означает антитело, которое не конъюгировано с гетерологическим компонентом (например, цитотоксическим компонентом) или радиометкой. Голое антитело может присутствовать в фармацевтической
25 композиции.

«Нативные антитела» относятся к природным молекулам иммуноглобулинов с различной структурой. Например, нативные IgG антитела представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой приблизительно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных
30 тяжелых цепей, которые связаны дисульфидной связью. В направлении от N-конца к C-концу каждая тяжелая цепь имеет переменный домен (VH), также называемый переменным тяжелым доменом или переменной областью тяжелой цепи, за которым следуют три константных тяжелых домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогично, в направлении от N-конца к C-концу каждая легкая цепь

содержит переменный домен (VL), также называемый переменным легким доменом или переменной областью легкой цепи, за которой следует постоянный легкий домен (CL).

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» относительно эталонной полипептидной последовательности определяется как процентная доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными с аминокислотными остатками в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и внесения, в случае необходимости, гэпов для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета каких-либо консервативных замен в качестве части идентичности последовательностей в целях выравнивания. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности можно осуществлять различными способами, которые известны в данной области техники, например, используя общедоступное компьютерное программное обеспечение, такое как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) или программный пакет FASTA. Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. В качестве альтернативы значения процента идентичности можно получить с помощью компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана Genentech, Inc., а исходный код был подан вместе с пользовательской документацией в Бюро регистрации авторских прав США, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, где он зарегистрирован под номером регистрации авторского права США TXU510087 и описан в WO 2001/007611.

Если не указано иное, в целях данного документа значения процента идентичности аминокислотной последовательности получают с использованием программы ggsearch из пакета FASTA версии 36.3.8c или более поздней с матрицей сравнения BLOSUM50. Программный пакет FASTA был создан W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), «Improved Tools for Biological Sequence Analysis», PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) «Effective protein sequence comparison» Meth. Enzymol. 266:227- 258; и Pearson et. al. (1997) Genomics 46:24-

36, и является общедоступным на www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml или <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta>. В качестве альтернативы публичный сервер, доступный на [fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi](http://www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi), можно использовать для сравнения последовательностей, используя программу `ggsearch` (`global protein:protein`) и параметры по умолчанию (`BLOSUM50`; `open: -10`; `продление: -2`; `Ktup = 2`) для обеспечения выполнения общего, а не местного, выравнивания. Процент идентичности аминокислот указывается в заголовке выходных данных выравнивания. Термин «молекула нуклеиновой кислоты» относится к последовательности оснований, включающей пуриновые и пиримидиновые основания, которые состоят из полинуклеотидов, при этом указанные основания представляют собой первичную структуру молекулы нуклеиновой кислоты. В данном документе термин «молекула нуклеиновой кислоты» включает ДНК, кДНК, геномную ДНК, РНК, синтетические формы ДНК и смешанные полимеры, содержащие две или более таких молекул. Кроме того, термин «молекула нуклеиновой кислоты» включает как смысловую, так и антисмысловую цепи. Кроме того, описанная в данном документе молекула нуклеиновой кислоты может содержать неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания, что будет с легкостью понимать специалист в данной области техники.

Термин «вкладыш в упаковку» используют для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно применения таких терапевтических продуктов.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в форме, делающей возможной эффективную биологическую активность содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительные компоненты, являющиеся неприемлемо токсичными для субъекта, которому будут вводить состав. Фармацевтическая композиция обычно содержит один или более фармацевтически приемлемых носителей.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель

включает без ограничения буфер, вспомогательное вещество, стабилизатор или консервант.

Используемый в данном документе термин «полипептид» относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи).

Термин «полипептид» относится к любой цепи из двух или более аминокислот и не относится к конкретной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, «белок», «аминокислотная цепь» или любой другой термин, используемый для обозначения цепи из двух или более аминокислот, включены в определение «полипептид», а термин «полипептид» можно использовать вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов. Подразумевается, что термин «полипептид» также относится к продуктам постэкспрессионных модификаций полипептида, включая, без ограничения, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию не встречающихся в природе аминокислот. Полипептид может быть получен из природного биологического источника или получен с помощью рекомбинантной технологии, но не обязательно транскрибируется с указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Его можно получить любым способом, в том числе путем химического синтеза. Размер полипептида по настоящему изобретению может составлять приблизительно 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или более, 1000 или более, или 2000 или более аминокислот. Полипептиды могут иметь определенную трехмерную структуру, хотя они не обязательно имеют такую структуру. Полипептиды с определенной трехмерной структурой называются свернутыми, а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, но могут принимать большое количество различных конформаций, называются развернутыми.

Термин «полинуклеотид» относится к выделенной молекуле или конструкту нуклеиновой кислоты, например, матричной РНК (мРНК), вирусной РНК или плазмидной ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать традиционную фосфодиэфирную связь или нетрадиционную связь (например, амидную связь, такую, как встречается в пептидных нуклеиновых кислотах

(ПНК)). Термин «молекула нуклеиновой кислоты» относится к любому одному или более сегментам нуклеиновой кислоты, например, фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде.

5 «Уменьшенное связывание», например, уменьшенное связывание с Fc-рецептором, относится к уменьшению аффинности для соответствующего взаимодействия, как определено, например, с помощью ППР. Для ясности этот термин также включает уменьшение аффинности до нуля (или ниже предела обнаружения аналитического способа), т.е. полное устранение взаимодействия. И наоборот, «повышенное связывание» относится к повышению аффинности
10 связывания для соответствующего взаимодействия.

Термин «регуляторная последовательность» относится к последовательностям ДНК, которые необходимы для осуществления экспрессии кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Природа таких контрольных последовательностей различается в зависимости от организма-
15 хозяина. У прокариот контрольные последовательности обычно включают промотор, сайт связывания рибосомы и терминаторы. У эукариот обычно контрольные последовательности включают промоторы, терминаторы и, в некоторых случаях, энхансеры, трансактиваторы или факторы транскрипции. Предполагается, что термин «контрольная последовательность» включает, как
20 минимум, все компоненты, присутствие которых необходимо для экспрессии, а также может включать дополнительные полезные компоненты.

Используемый в данном документе термин «одноцепочечный» относится к молекуле, содержащей аминокислотные мономеры, линейно связанные пептидными связями. В определенных вариантах осуществления один из
25 антигенсвязывающих фрагментов представляет собой одноцепочечную молекулу Fab, т.е. молекулу Fab, в которой легкая цепь Fab и тяжелая цепь Fab соединены пептидным линкером с образованием одной пептидной цепи. В конкретном варианте осуществления С-конец легкой цепи Fab соединен с N-концом тяжелой цепи Fab в одноцепочечной молекуле Fab. В предпочтительном варианте
30 осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv-фрагмент.

Используемый в данном документе термин «SSD» относится к стимулирующему сигнальному домену.

Используемый в данном документе термин «лечение» (и его грамматические варианты, такие как «лечить» или «осуществление лечения») относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения заболевания у индивидуума, которого лечат, и может проводиться как для профилактики, так и при течении клинической патологии. Необходимые эффекты лечения включают, но не ограничиваются этим, предотвращение появления или повторного появления заболевания, смягчение симптомов, уменьшение каких-либо прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению используют для задержки развития заболевания или для задержки прогрессирования заболевания.

Используемый в данном документе термин «активация Т-клеток» относится к одному или более клеточным ответам Т-лимфоцита, в частности цитотоксического Т-лимфоцита, выбранным из: пролиферации, дифференцировки, секреции цитокинов, высвобождения цитотоксических эффекторных молекул, цитотоксической активности и экспрессии маркеров активации. Иммуноактивирующие молекулы, связывающие Fc-домен, по настоящему изобретению способны индуцировать активацию Т-клеток. Подходящие анализы для определения активации Т-клеток известны в данной области техники и описаны в данном документе.

«Терапевтически эффективное количество» средства, например, фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения необходимого терапевтического или профилактического результата. Терапевтически эффективное количество средства, например, устраняет, снижает, задерживает, сводит к минимуму или предупреждает нежелательные явления заболевания.

Используемый в данном документе термин «валентный» обозначает наличие определенного числа антигенсвязывающих сайтов в антигенсвязывающей молекуле. Следовательно, термин «одновалентное связывание с антигеном» обозначает наличие одного (и не более одного)

антигенсвязывающего сайта, специфического в отношении антигена, в антигенсвязывающей молекуле.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL, соответственно) нативного антитела в общем случае имеют сходные структуры, причем каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три определяющие комплементарность области (CDR). (смотрите, например, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, можно выделять, используя домен VH или VL из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH, соответственно. Смотрите, например, Portolano et al. *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al. *Nature* 352:624-628 (1991)).

Используемый в данном документе термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной увеличивать число копий другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Этот термин включает вектор в виде самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую его внесли. Определенные векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе «векторами экспрессии».

Антигенсвязывающие рецепторы, способные к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим рецепторам, способным к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом антитела, например, терапевтического антитела, нацеленного на раковую клетку. В предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим рецепторам, способным к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом, содержащим аминокислотную мутацию R329G в соответствии с нумерацией EU. Антигенсвязывающие рецепторы по настоящему изобретению содержат внеклеточный домен, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, способный к специфическому связыванию с

мутантным Fc-доменом, но не способный к специфическому связыванию с исходным немутантным Fc-доменом. В предпочтительных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антигенсвязывающего рецептора представляет собой гуманизированный или человеческий антигенсвязывающий фрагмент, например, гуманизированный или человеческий scFv. В одном предпочтительном варианте осуществления аминокислотная мутация представляет собой P329G, а специфическое связывание с мутантным Fc-доменом, содержащим аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU, измеряют с помощью ППП при 25°C.

10 Настоящее изобретение также относится к трансдукции Т-клеток, таких как CD8+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD3+ Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки или Т-клетки естественные киллеры (NK), предпочтительно CD8+ Т-клетки, антигенсвязывающим рецептором, как описано в данном документе, и их целевое рекрутирование, например, в опухоль, с помощью молекулы антитела, например, терапевтического антитела, содержащего мутантный Fc-домен (например, Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU). В одном варианте осуществления антитело способно специфически связываться с опухолеспецифическим антигеном, естественным образом, встречающимся на поверхности опухолевой клетки.

20 Как показано в прилагаемых примерах, в качестве подтверждения концепции антигенсвязывающий рецептор, содержащий якорный трансмембранный домен и гуманизированный внеклеточный домен, в соответствии с изобретением (SEQ ID NO:7, кодируемая последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO:20), был сконструирован со способностью специфически связываться с терапевтическим антителом (представленным антителом к CD20, содержащим тяжелую цепь SEQ ID NO: 102 и легкую цепь SEQ ID NO:103), содержащим мутацию P329G. Трансдуцированные Т-клетки (Т-клетки Jurkat NFAT), экспрессирующие слитый белок VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD (SEQ ID NO:7, кодируемая последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO:20), могут быть сильно активированы путем совместной инкубации с антителом к CD20, содержащим мутацию P329G в Fc-домене вместе с CD20-позитивными опухолевыми клетками.

30 Обработка опухолевых клеток комбинацией антител, направленных против опухолевого антигена, причем антитело содержит мутацию P329G вместе

с трансдуцированными Т-клетками, экспрессирующими слитый белок VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD (SEQ ID NO:7, кодируемая последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO:20), неожиданно приводит к более сильной активации трансдуцированных Т-клеток по сравнению с трансдуцированными Т-клетками, экспрессирующими VL1VH3-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD (SEQ ID NO:31, кодируемая последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO:33).

В качестве дополнительного доказательства концепции были сконструированы антигенсвязывающие рецепторы согласно изобретению (SEQ ID NO:129 и 132 соответственно) и кодируемые последовательностью ДНК, показанной в SEQ ID NO:130 и 133, соответственно). Экспрессия и функция антигенсвязывающих рецепторов были показаны в линиях Т-клеток и Т-клетках доноров-людей. Оба рецептора содержат гуманизированный антигенсвязывающий фрагмент в конформации VHVL (т.е. VH3VL1) согласно изобретению.

В слитом белке VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD домен VH (VH3) слит на своем С-конце с N-концом домена VL (VL1) через пептидный линкер с образованием scFv. scFv слит на своем С-конце (С-конец домена VL) через пептидный линкер с якорным трансмембранным доменом (ATD). С другой стороны, в слитом белке VL1VH3-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD домен VL (VL1) слит на своем С-конце с N-концом домена VH (VH3) через пептидный линкер с образованием scFv. scFv слит на своем С-конце (С-конец домена VH) через пептидный линкер с якорным трансмембранным доменом (ATD). Не привязываясь к теории, наблюдение, что слитый белок VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD приводит к получению более сильной активации трансдуцированных Т-клеток по сравнению с VL1VH3-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD, предполагает, что слияние домена VL с якорным доменом (через пептидный линкер) приводит к получению более мощного антигенсвязывающего рецептора. Это неожиданно и удивительно.

Комбинация домена VH VH3 с доменом VL VL1, оба идентифицированы авторами настоящего изобретения, особенно благоприятна, поскольку эти переменные домены представляют собой домены гуманизированного антитела. Не ограничиваясь какой-либо теорией, гуманизированные домены антител являются предпочтительными, поскольку можно ожидать меньшего побочного

эффекта при применении антигенсвязывающих фрагментов, содержащих такие гуманизированные домены антител, у пациентов-людей (например, меньшее образование антител к лекарственному препарату (ADA)). Однако гуманизация может привести к потере связывания антигенсвязывающего фрагмента (например, полученного из отличного от человеческого источника). Как показано в прилагаемых примерах, гуманизированные домены VH3 и VL1 сохраняют связывание с Fc-доменом, содержащим аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU. Этот результат является неожиданным, показанным, например, неспособностью других гуманизированных доменов VH и VL сохранять сравнимое связывание с Fc-доменом, содержащим аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий гуманизированный антигенсвязывающий фрагмент, способный специфически связываться с Fc-доменом, содержащим аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU. Концепция настоящего изобретения и его компоненты (гуманизированный антигенсвязывающий рецептор и терапевтическое антитело) дополнительно подробно описаны ниже.

Согласно настоящему изобретению спаривание опухолеспецифического антитела, т. е. терапевтического антитела, содержащего мутантный Fc-домен (например, содержащего аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU), с Т-клетками, трансдуцированными антигенсвязывающим рецептором, которые содержат/состоят из внеклеточного домена, содержащего антигенсвязывающий фрагмент, способный специфически связываться с мутантным Fc-доменом, приводит к специфической активации Т-клеток и последующему лизису опухолевых клеток. Этот подход имеет значительные преимущества в плане безопасности по сравнению с традиционными подходами, основанными на Т-клетках, поскольку Т-клетка была бы инертной в отсутствие антитела, содержащего мутантный Fc-домен. Соответственно, изобретение обеспечивает универсальную терапевтическую платформу, в которой антитела типа IgG используются для маркировки или мечения опухолевых клеток в качестве ориентира для Т-клеток, и в которой трансдуцированные Т-клетки специфически нацелены на опухолевые клетки, обеспечивая специфичность в отношении мутантного Fc-домена антитела типа IgG. После связывания с

мутантным Fc-доменом антитела на поверхности опухолевой клетки трансдуцированная Т-клетка, описанная в данном документе, активируется, а опухолевая клетка впоследствии подвергается лизису. Платформа является гибкой и специфичной, позволяя использовать различные (существующие или
5 недавно разработанные) антитела-мишени или совместное применение нескольких антител с различной антигенной специфичностью, но содержащих одну и ту же мутацию в Fc-домене (например, мутацию P329G). Степень активации Т-клеток можно дополнительно регулировать, регулируя дозировку совместно применяемого терапевтического антитела или переключаясь на
10 другую специфичность или форматы антител. Трансдуцированные Т-клетки по изобретению являются инертными без совместного применения нацеливающего антитела, содержащего мутантный Fc-домен, поскольку описанные в данном документе мутации Fc-домена не встречаются в природных или немутантных иммуноглобулинах. Соответственно, в одном варианте осуществления
15 мутантный Fc-домен в природе не встречается в (человеческих) иммуноглобулинах.

Соответственно, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему рецептору, содержащему внеклеточный домен, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, способный
20 специфически связываться с мутантным Fc-доменом, причем по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент не способен специфически связываться с родительским не мутантным Fc-доменом. Может быть особенно желательным использовать терапевтические антитела со сниженной эффекторной функцией в
терапии рака, поскольку эффекторная функция может привести к серьезным
25 побочным эффектам лечения опухолей на основе антител, как дополнительно описано в данном документе.

В контексте настоящего изобретения антигенсвязывающий рецептор содержит внеклеточный домен, который в природе не встречается в Т-клетках или на них. Таким образом, антигенсвязывающий рецептор способен
30 обеспечивать адаптированную специфичность связывания с клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий рецептор по изобретению. Клетки, например, Т-клетки, трансдуцированные антигенсвязывающим(ими) рецептором(ами) по изобретению, становятся способными к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом, но не с мутантным родительским Fc-

доменом. Специфичность обеспечивается антигенсвязывающим фрагментом внеклеточного домена антигенсвязывающего рецептора. В контексте настоящего изобретения и как объясняется в данном документе, антигенсвязывающий фрагмент, способный к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом, связывается/взаимодействует с мутантным Fc-доменом, но не с мутантным родительским Fc-доменом.

Антигенсвязывающие фрагменты

В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения в качестве доказательства концепции представлены гуманизированные антигенсвязывающие рецепторы, способные к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом, содержащим аминокислотную мутацию P329G, и эффекторные клетки, экспрессирующие указанные антигенсвязывающие рецепторы. Мутация P329G уменьшает связывание с Fc γ -рецепторами и связанную с ними эффекторную функцию. Соответственно, мутантный Fc-домен, содержащий мутацию P329G, связывается с Fc γ -рецепторами с уменьшенной или устраненной аффинностью по сравнению с немутантным Fc-доменом.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент способен к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом, состоящим из первой и второй субъединицы, способных к стабильной ассоциации. В одном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG, в частности Fc-домен IgG₁ или IgG₄. В одном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен человека. В одном варианте осуществления мутантный Fc-домен проявляет уменьшенную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или уменьшенную эффекторную функцию по сравнению с нативным Fc-доменом IgG₁. В одном варианте осуществления Fc-домен содержит одну или более аминокислотных мутаций, которые снижают связывание с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

В предпочтительном варианте осуществления мутантный Fc-домен содержит мутацию P329G. Соответственно, мутантный Fc-домен, содержащий мутацию P329G, связывается с Fc γ -рецепторами с уменьшенной или устраненной аффинностью по сравнению с немутантным Fc-доменом.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий фрагмент. В

одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен способен специфически связываться с Fc-доменом, содержащим аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент
5 содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий по меньшей мере одну из:

(a) аминокислотной последовательности определяющей комплементарность области тяжелой цепи (CDR H) 1 RYWMN (SEQ ID NO:1);

(b) аминокислотной последовательности CDR H2
10 EITPDSSTINYAPSLKG (SEQ ID NO:2) или EITPDSSTINYTPSLKG (SEQ ID NO:40); и

(c) аминокислотной последовательности CDR H3 PYDYGAWFAS (SEQ ID NO:3).

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент
15 содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий по меньшей мере одну из:

(d) аминокислотной последовательности (CDR L) 1 легкой цепи RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:4);

(e) аминокислотной последовательности CDR L2 GTNKRAP (SEQ ID
20 NO:5); и

(f) аминокислотной последовательности CDR L3 ALWYSNHWV (SEQ ID NO:6).

В предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

25 (a) аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области тяжелой цепи (CDR H) 1 RYWMN (SEQ ID NO:1);

(b) аминокислотную последовательность CDR H2
EITPDSSTINYAPSLKG (SEQ ID NO:2) или EITPDSSTINYTPSLKG (SEQ ID
NO:40);

30 (c) аминокислотную последовательность CDR H3 PYDYGAWFAS (SEQ ID NO:3);

и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий:

(d) аминокислотную последовательность (CDR L) 1 легкой цепи RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:4);

(e) аминокислотную последовательность CDR L2 GTNKRAP (SEQ ID NO:5); и

(f) аминокислотную последовательность CDR L3 ALWYSNHWV (SEQ ID NO:6).

5 В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

(a) аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области тяжелой цепи (CDR H) 1 RYWMN (SEQ ID NO:1);

10 (b) аминокислотную последовательность CDR H2 EITPDSSTINYAPSLKG (SEQ ID NO:2);

(c) аминокислотную последовательность CDR H3 PYDYGAWFAS (SEQ ID NO:3);

и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий:

15 (d) аминокислотную последовательность (CDR L) 1 легкой цепи RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:4);

(e) аминокислотную последовательность CDR L2 GTNKRAP (SEQ ID NO:5); и

(f) аминокислотную последовательность CDR L3 ALWYSNHWV (SEQ ID NO:6).

20 В другом конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий:

(a) аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области тяжелой цепи (CDR H) 1 RYWMN (SEQ ID NO:1);

25 (b) аминокислотную последовательность CDR H2 EITPDSSTINYTPSLKG (SEQ ID NO:40);

(c) аминокислотную последовательность CDR H3 PYDYGAWFAS (SEQ ID NO:3);

и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий:

30 (d) аминокислотную последовательность (CDR L) 1 легкой цепи RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:4);

(e) аминокислотную последовательность CDR L2 GTNKRAP (SEQ ID NO:5); и

(f) аминокислотную последовательность CDR L3 ALWYSNHWV (SEQ ID NO:6).

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:41 и SEQ ID NO:44.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:41.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:44.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:126.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%,

96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:127.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 5
приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8, и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 10
100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 15
приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:41, и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 10
100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 20
приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:44, и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 25
100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9.

В другом варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 30
приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:126, и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 10
100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:127.

В предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9.

В другом предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:126, и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:127.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv или scFab. В предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH соединен с доменом VL, в частности, через пептидный линкер. В одном варианте осуществления С-конец домена VL соединен с N-концом домена VH, в частности, через пептидный линкер. В предпочтительном варианте осуществления С-конец домена VH соединен с N-концом домена VL, в частности, через пептидный линкер. В одном варианте осуществления пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:16).

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv, который является полипептидом, состоящим из переменного домена тяжелой цепи (VH), переменного домена легкой цепи (VL) и линкера, причем указанные переменные домены и указанный линкер имеют одну из следующих конфигураций в направлении от N-конца к С-концу: а) VH-линкер-VL или б) VL-линкер-VH. В предпочтительном варианте осуществления scFv имеет конфигурацию VH-линкер-VL.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:122 и SEQ ID NO:124.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:122. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:122.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:124. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:124.

Антигенсвязывающие фрагменты, содержащие переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), такие как фрагменты scFv и scFab, описанные в данном документе, могут быть дополнительно стабилизированы путем введения межцепочечных дисульфидных мостиков между доменами VH и VL. Соответственно, в одном варианте осуществления scFv-фрагмент(ы) и/или scFab-фрагмент(ы), содержащиеся в антигенсвязывающих рецепторах в соответствии с изобретением, дополнительно стабилизируются за счет образования межцепочечных дисульфидных связей посредством вставки остатков цистеина (например, в положении 44 в переменной области тяжелой цепи и в положении 100 в переменной области легкой цепи в соответствии с нумерацией по Кабату). В одном варианте осуществления предусмотрена любая из представленных выше последовательностей VH и/или VL, содержащая по меньшей мере одну замену аминокислоты на цистеин (в частности, в положении 44 в переменной области тяжелой цепи и/или в положении 100 в переменной области легкой цепи в соответствии с нумерацией по Кабату).

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:128. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:128.

Якорный трансмембранный домен (ATD)

В контексте настоящего изобретения якорный трансмембранный домен антигенсвязывающих рецепторов по настоящему изобретению может характеризоваться отсутствием сайта расщепления для протеаз млекопитающих. В контексте настоящего изобретения протеазы относятся к протеолитическим ферментам, которые способны гидролизовать аминокислотную последовательность трансмембранного домена, содержащего сайт расщепления для протеазы. Термин протеазы включает как эндопептидазы, так и экзопептидазы. В контексте настоящего изобретения любой якорный трансмембранный домен трансмембранного белка, указанный среди прочих в номенклатуре CD, может быть использован для создания антигенсвязывающих рецепторов по изобретению.

Соответственно, в контексте настоящего изобретения якорный трансмембранный домен может включать часть мышинового/мышь трансмембранного домена или предпочтительно трансмембранного домена человека. Примером такого якорного трансмембранного домена является трансмембранный домен CD8, например, имеющий аминокислотную последовательность, показанную в данном документе в SEQ ID NO:11 (кодируемая последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO:24). В контексте настоящего изобретения якорный трансмембранный домен антигенсвязывающего рецептора по настоящему изобретению может содержать/в его состав может входить аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO:11 (кодируемая последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO:24).

В другом варианте осуществления представленный в данном документе антигенсвязывающий рецептор может содержать трансмембранный домен CD28, который расположен в аминокислотах 153-179, 154-179, 155-179, 156-179, 157-179, 158-179, 159-179, 160-179, 161-179, 162-179, 163-179, 164-179, 165-179, 166-

179, 167-179, 168-179, 169-179, 170-179, 171-179, 172-179, 173-179, 174-179, 175-179, 176-179, 177-179 или 178-179 полноразмерного белка CD28 человека, показанного в SEQ ID NO:61 (кодируемая кДНК, показанной в SEQ ID NO:70).

5 В качестве альтернативы, любой белок, имеющий трансмембранный домен, как предусмотрено среди прочего номенклатурой CD, может использоваться в качестве якорного трансмембранного домена белка антигенсвязывающего рецептора по изобретению.

10 В некоторых вариантах осуществления якорный трансмембранный домен содержит трансмембранный домен любой из групп, состоящих из CD27 (SEQ ID NO:59 кодируемой SEQ ID NO:58), CD137 (SEQ ID NO:67 кодируемой SEQ ID NO:66), OX40 (SEQ ID NO:71, кодируемой SEQ ID NO:70), ICOS (SEQ ID NO:75 кодируемой SEQ ID NO:74), DAP10 (SEQ ID NO:80 кодируемой SEQ ID NO:79), DAP12 (SEQ ID NO:83 кодируемой SEQ ID NO:82), CD3z (SEQ ID NO:88 кодируемой SEQ ID NO:87), FCGR3A (SEQ ID NO:90 кодируемой SEQ ID NO:91), NKG2D (SEQ ID NO:94 кодируемой SEQ ID NO:95), CD8 (SEQ ID NO:119 кодируемой SEQ ID NO:120) или их трансмембранного фрагмента, который сохраняет способность заякоривать антигенсвязывающий рецептор к мембране.

20 Последовательности человека могут быть полезными в контексте общего изобретения, например, потому что (части) якорного трансмембранного домена могут быть доступны из внеклеточного пространства и, следовательно, для иммунной системы пациента. В предпочтительном варианте осуществления якорный трансмембранный домен содержит последовательность человека. В таких вариантах осуществления якорный трансмембранный домен содержит трансмембранный домен любой из групп, состоящих из CD27 человека (SEQ ID NO:57 кодируемой SEQ ID NO:56), CD137 человека (SEQ ID NO:65 кодируемой SEQ ID NO:64), OX40 человека (SEQ ID NO:69, кодируемой SEQ ID NO:68), ICOS человека (SEQ ID NO:73 кодируемой SEQ ID NO:72), DAP10 человека (SEQ ID NO:78 кодируемой SEQ ID NO:77), DAP12 человека (SEQ ID NO:81 кодируемой SEQ ID NO:80), CD3z человека (SEQ ID NO:86 кодируемой SEQ ID NO:85), FCGR3A человека (SEQ ID NO:88 кодируемой SEQ ID NO:89), NKG2D человека (SEQ ID NO:92 кодируемой SEQ ID NO:93), CD8 человека (SEQ ID NO:117 кодируемой SEQ ID NO:118) или их трансмембранного фрагмента,

который сохраняет способность заякоривать антигенсвязывающий рецептор к мембране.

Стимулирующий сигнальный домен (SSD) и костимулирующий сигнальный домен (CSD)

5 Предпочтительно антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один стимулирующий сигнальный домен и/или по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен. Соответственно, в данном документе представлен антигенсвязывающий рецептор, предпочтительно содержащий стимулирующий сигнальный домен,
10 который обеспечивает активацию Т-клеток. Предложенный в данном документе антигенсвязывающий рецептор может содержать стимулирующий сигнальный домен, который представляет собой фрагмент/часть полипептида CD3z мышиноного/мыши или человека (запись UniProt CD3z человека представляет собой P20963 (номер версии 177 с порядковым номером 2; запись UniProt CD3z
15 мышинный/мыши представляет собой P24161 (первичный цитируемый номер доступа) или Q9D3G3 (вторичный цитируемый номер доступа) с номером версии 143 и порядковым номером 1)), Fcgr3A (запись UniProt FCGR3A человека представляет собой P08637 (номер версии 178 с последовательностью номер 2)) или NKG2D (запись UniProt человеческого NKG2D представляет собой P26718
20 (номер версии 151 с порядковым номером 1); запись UniProt мышиноного/мыши NKG2D представляет собой O54709 (номер версии 132 с порядковым номером 2)).

Таким образом, стимулирующий сигнальный домен, который содержится в представленном в данном документе антигенсвязывающем рецепторе, может
25 являться фрагментом/частью полноразмерного полипептида CD3z, FCGR3A или NKG2D. Аминокислотные последовательности полноразмерного CD3z или NKG2D мышиноного/мыши показаны в данном документе как SEQ ID NO: 86 (CD3z), 90 (FCGR3A) или 94 (NKG2D) (мышиноного/мыши, кодируемого последовательностями ДНК, показанными в SEQ ID NO:87 (CD3z), 91 (FCGR3A)
30 или 95 (NKG2D). Аминокислотные последовательности полноразмерного CD3z, FCGR3A или NKG2D человека показаны в данном документе как SEQ ID NO:84 (CD3z), 88 (FCGR3A) или 92 (NKG2D) (человеческие, кодируемые последовательностями ДНК, показаны в SEQ ID NO:85 (CD3z), 89 (FCGR3A) или 93 (NKG2D)). Антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению

может содержать фрагменты CD3z, FCGR3A или NKG2D в качестве стимулирующего домена при условии, что он содержит по меньшей мере один сигнальный домен. В частности, любая часть/фрагмент CD3z, FCGR3A или NKG2D подходит в качестве стимулирующего домена, если он содержит по меньшей мере один сигнальный мотив. Однако более предпочтительно антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению содержит полипептиды, происходящие от человека. Таким образом, более предпочтительно, представленный в данном документе антигенсвязывающий рецептор содержит аминокислотные последовательности, представленные в данном документе как SEQ ID NO:84 (CD3z), 88 (FCGR3A) или 92 (NKG2D) (человеческие, кодируемые последовательностями ДНК, представленными в SEQ ID NO:85 (CD3z), 89 (FCGR3A) или 93 (NKG2D)). В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению может содержать или в его состав может входить аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO:13 (кодируемая последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO:26). В дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающий рецептор содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:13, или последовательность, которая имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO:13, и которая характеризуется наличием стимулирующей сигнальной активности. Конкретные конфигурации антигенсвязывающих рецепторов, содержащих стимулирующий сигнальный домен (SSD), представлены в данном документе ниже, а также в примерах и на Фигурах. Можно определить стимулирующую сигнальную активность; например, по усиленному высвобождению цитокинов, измеренному с помощью ИФА (IL-2, IFN γ , TNF α), усиленной пролиферативной активности (измеренной по увеличению количества клеток) или повышенной литической активности, измеренной с помощью анализов высвобождения LDH.

Более того, представленный в данном документе антигенсвязывающий рецептор предпочтительно содержит по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен, который обеспечивает дополнительную активность Т-клеток. Предложенный в данном документе антигенсвязывающий рецептор может содержать костимулирующий сигнальный домен, который представляет собой

фрагмент/часть полипептида CD28 мышиноного/мышы или человека (запись UniProt CD28 человека представляет собой P10747 (номер версии 173 с порядковым номером 1); запись UniProt CD28 мышиноного/мышы представляет собой P31041 (номер версии 134 с порядковым номером 2)), CD137 (запись UniProt CD137 человека представляет собой Q07011 (номер версии 145 с порядковым номером 1); запись UniProt CD137 мышиноного/мышы представляет собой P20334 (номер версии 139 с порядковым номером 1)), OX40 (запись UniProt OX40 человека представляет собой P23510 (номер версии 138 с порядковым номером 1); запись UniProt OX40 мышиноного/мышы представляет собой P43488 (номер версии 119 с порядковым номером 1)), ICOS (запись UniProt ICOS человека представляет собой Q9Y6W8 (номер версии 126 с порядковым номером 1)); запись UniProt Entry ICOS мышиноного/мышы представляет собой Q9WV40 (первичный цитируемый номер доступа) или Q9JL17 (вторичный цитируемый номер доступа) с номером версии 102 и версии последовательности 2)), CD27 (запись UniProt CD27 человека представляет собой P26842 (версия номер 160 с порядковым номером 2); запись UniProt CD27 мышиноного/мышы представляет собой P41272 (номер версии 137 с версией последовательности 1)), 4-1-BB (запись UniProt мышиноного/мышы 4-1-BB представляет собой P20334 (номер версии 140 с версией последовательности 1); запись UniProt 4-1-BB человека представляет собой Q07011 (номер версии 146 с версией последовательности)), DAP10 (запись UniProt DAP10 человека представляет собой Q9UBJ5 (номер версии 25 с версией последовательности номер 1); запись UniProt DAP10 мышиноного/мышы представляет собой Q9QUJ0 (первичный цитируемый номер доступа) или Q9R1E7 (вторичный цитируемый номер доступа) с номером версии 101 и порядковым номером 1)) или DAP12 (запись UniProt DAP12 человека представляет собой O43914 (номер версии 146 и порядковый номер 1); запись UniProt DAP12 мышиноного/мышы имеет номер O054885 (первичный номер доступа) или Q9R1E7 (вторичный номер доступа) с номером версии 123 и порядковым номером 1). В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению может содержать один или более, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 определенных в данном документе костимулирующих сигнальных доменов. Соответственно, в контексте настоящего изобретения антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению может содержать

фрагмент/часть полипептида CD137 мышиноного/мышы или предпочтительно человека в качестве первого костимулирующего сигнального домена второго костимулирующего сигнального домена, выбранного из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 и DAP12 мышиноного/мышы или предпочтительно человека или их фрагментов. Предпочтительно антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению содержит костимулирующий сигнальный домен, происходящий от человека. Таким образом, более предпочтительно костимулирующий сигнальный домен(ы), который(е) содержится(атся) в антигенсвязывающем рецепторе по настоящему изобретению может (могут) содержать или в его (их) состав может входить аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO:12 (кодируемая последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO:25).

Таким образом, костимулирующий сигнальный домен, который может необязательно содержаться в представленном в данном документе антигенсвязывающем рецепторе, представляет собой фрагмент/часть полипептида полноразмерного CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 или DAP12. Аминокислотные последовательности полноразмерных CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, CD27, DAP10 и DAP12 мышиноного/мышы представлены в данном документе как SEQ ID NO:59 (CD27), 63 (CD28), 67 (CD137), 71 (OX40), 75 (ICOS), 79 (DAP10) или 83 (DAP12) (мышиноного/мышы, кодируемая последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO:58 (CD27), 62 (CD28), 66 (CD137), 70 (OX40), 74 (ICOS), 78 (DAP10) или 82 (DAP12)). Однако, поскольку последовательности человека являются наиболее предпочтительными в контексте настоящего изобретения, костимулирующий сигнальный домен, который может необязательно содержаться в представленном в данном документе антигенсвязывающем рецепторе белка представляет собой фрагмент/часть полипептида полноразмерного CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 или DAP12 человека. Аминокислотные последовательности полноразмерного CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 или DAP12 человека показаны в данном документе как SEQ ID NO: 57, (CD27), 61 (CD28), 65 (CD137), 69 (OX40), 73 (ICOS), 77 (DAP10) или 81 (DAP12) (человеческие, кодируемые последовательностями ДНК, представленными в SEQ ID NO: 56 (CD27), 60 (CD28), 64 (CD137), 68 (OX40), 72 (ICOS), 76 (DAP10) или 80 (DAP12)).

В одном предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор содержит CD28 или его фрагмент в качестве костимулирующего сигнального домена. Предложенный в данном документе антигенсвязывающий рецептор может содержать фрагмент CD28 в качестве костимулирующего сигнального домена при условии, что он содержит по меньшей мере один сигнальный домен CD28. В частности, любая часть/фрагмент CD28 подходит для антигенсвязывающего рецептора по изобретению при условии, что она/он содержит по меньшей мере один из сигнальных мотивов CD28. Костимулирующие сигнальные домены PYAP (AA 208-211 CD28) и YMNM (AA 191-194 CD28) благотворно влияют на функцию полипептида CD28 и функциональные эффекты, перечисленные выше. Аминокислотная последовательность домена YMNM показана в SEQ ID NO:96; аминокислотная последовательность домена PYAP показана в SEQ ID NO:97. Соответственно, в антигенсвязывающем рецепторе по настоящему изобретению полипептид CD28 предпочтительно содержит последовательность, полученную из внутриклеточного домена полипептида CD28, имеющую последовательности YMNM (SEQ ID NO:96) и/или PYAP (SEQ ID NO:97). В других вариантах осуществления в антигенсвязывающем рецепторе по настоящему изобретению один или оба этих домена мутированы в FMNM (SEQ ID NO:98) и/или AYAA (SEQ ID NO:99), соответственно. Любая из этих мутаций снижает способность трансдуцированной клетки, содержащей антигенсвязывающий рецептор, высвобождать цитокины, не влияя на ее способность к пролиферации, и может успешно использоваться для продления жизнеспособности и, таким образом, терапевтического потенциала трансдуцированных клеток. Или, другими словами, такая нефункциональная мутация предпочтительно увеличивает персистенцию клеток, трансдуцированных представленным в данном документе антигенсвязывающим рецептором *in vivo*. Однако эти сигнальные мотивы могут присутствовать в любом месте внутриклеточного домена представленного в данном документе антигенсвязывающего рецептора.

В другом предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор содержит CD137 или его фрагмент в качестве костимулирующего сигнального домена. Предложенный в данном документе антигенсвязывающий рецептор может содержать фрагмент CD137 в качестве костимулирующего сигнального домена при условии, что он содержит по

меньшей мере один сигнальный домен CD137. В частности, любая часть/фрагмент CD137 подходит для антигенсвязывающего рецептора по изобретению при условии, что она/он содержит по меньшей мере один из сигнальных мотивов CD137. В предпочтительном варианте осуществления полипептид CD137, который содержится в антигенсвязывающем рецепторе белка по настоящему изобретению, содержит или в его состав входит аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO:12 (кодируемая последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO:25).

Конкретные конфигурации антигенсвязывающих рецепторов, содержащих костимулирующий сигнальный домен (CSD), представлены в данном документе ниже, а также в примерах и на Фигурах. Можно определить костимулирующую сигнальную активность; например, по усиленному высвобождению цитокинов, измеренному с помощью ИФА (IL-2, IFN α , TNF α), усиленной пролиферативной активности (измеренной по увеличению количества клеток) или повышенной литической активности, измеренной с помощью анализов высвобождения LDH. Как упоминалось выше, в одном варианте осуществления настоящего изобретения костимулирующий сигнальный домен антигенсвязывающего рецептора может быть получен из человеческого гена CD28 и/или CD137 Т-клеточной активности, определяемой как продукция цитокинов, пролиферация и литическая активность трансдуцированной клетки, описанной в данном документе, подобная трансдуцированной Т-клетке. Активность CD28 и/или CD137 можно измерить по высвобождению цитокинов с помощью ИФА или проточной цитометрии цитокинов, таких как гамма-интерферон (IFN- γ) или интерлейкин 2 (IL-2)), пролиферацию Т-клеток измеряли, например, с помощью измерения ki67, количественного определения клеток с помощью проточной цитометрии или литической активности, оцениваемой путем измерения импеданса клетки-мишени в реальном времени (с использованием, например, прибора ICELLigence, описанного, например в Thakur et al., Biosens Bioelectron. 35(1) (2012), 503-506; Krutzik et al., Methods Mol Biol. 699 (2011), 179-202; Ekkens et al., Infect Immun. 75(5) (2007), 2291-2296; Ge et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 99(5) (2002), 2983-2988; Düwell et al., Cell Death Differ. 21(12) (2014), 1825-1837, Erratum in: Cell Death Differ. 21(12) (2014), 161).

Линкер и сигнальные пептиды

Кроме того, представленный в данном документе антигенсвязывающий рецептор может содержать по меньшей мере один линкер (или «спейсер»). Линкер обычно представляет собой пептид, имеющий длину до 20 аминокислот. Соответственно, в контексте настоящего изобретения линкер может иметь длину

5 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. Например, представленный в данном документе антигенсвязывающий рецептор может содержать линкер между внеклеточным доменом, содержащим по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, способный к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом, якорным

10 трансмембранным доменом, костимулирующим сигнальным доменом и/или стимулирующим сигнальным доменом. Более того, представленный в данном документе антигенсвязывающий рецептор может содержать линкер в антигенсвязывающем фрагменте, в частности, между иммуноглобулиновыми доменами антигенсвязывающего фрагмента (например, между доменами VH и

15 VL scFv). Преимущество таких линкеров состоит в том, что они увеличивают вероятность того, что различные полипептиды антигенсвязывающего рецептора (т. е. внеклеточный домен, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, якорный трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен и/или стимулирующий сигнальный домен)

20 складываются независимо и ведут себя так, как ожидалось. Таким образом, в контексте настоящего изобретения внеклеточный домен, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, якорный трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен и стимулирующий сигнальный домен может быть включен в состав одноцепочечного многофункционального

25 полипептида. Одноцепочечный слитый конструктор, например, может состоять из полипептида(ов), включающего(их) внеклеточный(ые) домен(ы), содержащий(ие) по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, якорный(ие) трансмембранный(ые) домен(ы), костимулирующий(ие) сигнальный(ые) домен(ы) и/ или стимулирующий(ие) сигнальный(ые) домен(ы).

30 Соответственно, антигенсвязывающий фрагмент, якорный трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен и стимулирующий сигнальный домен могут быть связаны одним или более идентичными или разными пептидными линкерами, описанными в данном документе. Например, в представленном в данном документе антигенсвязывающем рецепторе линкер

между внеклеточным доменом, содержащим по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент и якорный трансмембранный домен, может содержать или в его состав может входить аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO:17. В другом варианте осуществления линкер между антигенсвязывающим фрагментом и якорным трансмембранным доменом содержит или в его состав входит аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO:19. Соответственно, якорный трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен и/или стимулирующий домен могут быть соединены друг с другом пептидными линкерами или, альтернативно, путем прямого слияния доменов.

В предпочтительных вариантах осуществления согласно изобретению антигенсвязывающий фрагмент, содержащийся во внеклеточном домене, представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который представляет собой слитый белок переменных доменов тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей антитела, соединенный коротким линкерным пептидом из десяти до приблизительно 25 аминокислот. Линкер обычно обогащен глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости, и может соединять N-конец VH с C-концом VL или наоборот. В предпочтительном варианте осуществления линкер соединяет N-конец домена VL с C-концом домена VH. Например, в представленном в данном документе антигенсвязывающем рецепторе линкер может иметь аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:16. Антитела scFv представляют собой, например, описанные в Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96).

В некоторых вариантах осуществления по изобретению антигенсвязывающий фрагмент, содержащийся во внеклеточном домене, представляет собой «одноцепочечный Fab-фрагмент» или «scFab», который представляет собой полипептид, состоящий из переменного домена тяжелой цепи (VH), константного домена антитела 1 (CH1), переменного домена легкой цепи (VL), константного домена легкой цепи антитела (CL) и линкера, причем указанные домены антитела и указанный линкер имеют один из следующих вариантов упорядочения в направлении от N-конца к C-концу: а) VH-CH1-линкер-VL-CL, б) VL-CL-линкер-VH-CH1, в) VH-CL-линкер-VL-CH1 или д) VL-CH1-линкер-VH-CL; и причем указанный линкер представляет собой

полипептид из по меньшей мере 30 аминокислот, предпочтительно от 32 до 50 аминокислот. Указанные одноцепочечные Fab-фрагменты стабилизированы посредством естественной дисульфидной связи между доменом CL и доменом CH1.

5 Предложенный в данном документе антигенсвязывающий рецептор или его часть может содержать сигнальный пептид. Такой сигнальный пептид выведет белок на поверхность мембраны T-клетки. Например, в представленном в данном документе антигенсвязывающем рецепторе сигнальный пептид может иметь аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:100
10 (кодируемая последовательностью ДНК, представленной в SEQ ID NO:101).

Антигенсвязывающие рецепторы, активирующие T-клетки, способные к специфическому связыванию с мутантными Fc-доменами

Компоненты антигенсвязывающих рецепторов, описанные в данном документе, могут быть слиты друг с другом в различных конфигурациях с
15 образованием антигенсвязывающих рецепторов, активирующих T-клетки.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий рецептор содержит внеклеточный домен, состоящий из варибельного домена тяжелой цепи (VH) и варибельного домена легкой цепи (VL), соединенных с якорным трансмембранным доменом. В предпочтительных вариантах осуществления домен VH слит на С-конце с N-концом домена VL, необязательно через пептидный линкер. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий рецептор дополнительно содержит стимулирующий сигнальный домен и/или костимулирующий сигнальный домен. В конкретном таком варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор по существу состоит из домена
20 VH и домена VL, якорного трансмембранного домена и, необязательно, стимулирующего сигнального домена, соединенного одним или более пептидными линкерами, причем домен VH слит на С-конце с N-концом домена VL, а домен VL слит на С-конце с N-концом якорного трансмембранного домена, при этом якорный трансмембранный домен слит на С-конце с N-концом
25 стимулирующего сигнального домена. Необязательно антигенсвязывающий рецептор дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен. В одном таком конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор по существу состоит из домена VH и домена VL, якорного трансмембранного домена, стимулирующего сигнального домена и

костимулирующего сигнального домена соединенного одним или более пептидными линкерами, причем домен VH слит на С-конце с N-концом домена VL, а домен VL слит на С-конце с N-концом якорного трансмембранного домена, при этом якорный трансмембранный домен слит на С-конце с N-концом стимулирующего сигнального домена, при этом стимулирующий сигнальный домен слит на С-конце с N-концом костимулирующего сигнального домена. В альтернативном варианте осуществления костимулирующий сигнальный домен связан с якорным трансмембранным доменом вместо стимулирующего сигнального домена. В предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор по существу состоит из домена VH и домена VL, якорного трансмембранного домена, костимулирующего сигнального домена и стимулирующего сигнального домена соединенного одним или более пептидными линкерами, причем домен VH слит на С-конце с N-концом домена VL, а домен VL слит на С-конце с N-концом якорного трансмембранного домена, при этом якорный трансмембранный домен слит на С-конце с N-концом костимулирующего сигнального домена, при этом костимулирующий сигнальный домен слит на С-конце с N-концом костимулирующего сигнального домена.

Антигенсвязывающий фрагмент, якорный трансмембранный домен и стимулирующие сигнальные и/или костимулирующие сигнальные домены могут быть слиты друг с другом непосредственно или через один или более пептидных линкеров, содержащих одну или более аминокислот, обычно приблизительно 2-20 аминокислот. Пептидные линкеры известны в данной области техники и описаны в данном документе. Подходящие неиммуногенные пептидные линкеры включают, например, пептидные линкеры $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ или $G_4(SG_4)_n$, где n в общем случае является числом от 1 до 10, как правило, от 2 до 4. Предпочтительный пептидный линкер для соединения антигенсвязывающего фрагмента и якорного трансмембранного фрагмента представляет собой GGGGS (G_4S) в соответствии с SEQ ID NO:17. Другой предпочтительный пептидный линкер для соединения антигенсвязывающего фрагмента и якорного трансмембранного фрагмента представляет собой KPTTTPAPRPPTPAPRTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (CD8stalk) в соответствии с SEQ ID NO:19. Типовой пептидный линкер, подходящий для соединения переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена

легкой цепи (VL), представляет собой GGGSGGGSGGGSGGGS (G₄S)₄ в соответствии с SEQ ID NO:16.

В качестве дополнения линкеры могут содержать шарнирную область иммуноглобулина (или ее часть). В частности, если антигенсвязывающий фрагмент слит с N-концом якорного трансмембранного домена, он может быть слит посредством шарнирной области иммуноглобулина или ее части с или без дополнительного пептидного линкера.

Описанные в данном документе антигенсвязывающие рецепторы по настоящему изобретению содержат внеклеточный домен, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент. Антигенсвязывающий рецептор с одним антигенсвязывающим фрагментом, способным к специфическому связыванию с антигеном клетки-мишени, полезен и предпочтителен, особенно в случаях, когда необходима высокая экспрессия антигенсвязывающего рецептора. В таких случаях присутствие более чем одного антигенсвязывающего фрагмента, специфичного в отношении антигена клетки-мишени, может ограничивать эффективность экспрессии антигенсвязывающего рецептора. При этом в других случаях преимущественной является антигенсвязывающий рецептор, содержащий два или более антигенсвязывающих фрагментов, специфичных в отношении антигена клетки-мишени, например, для оптимизации нацеливания на сайт-мишень или для обеспечения перекрестного связывания антигенов клетки-мишени.

В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор содержит один антигенсвязывающий фрагмент, способный к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом, в частности, с Fc-доменом IgG1, содержащим мутацию P329G (в соответствии с нумерацией EU). В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент, способный к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом, но не способный к специфическому связыванию с немутантным исходным Fc-доменом, представляет собой scFv.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент слит на C-конце scFv-фрагмента с N-концом якорного трансмембранного домена, необязательно через пептидный линкер. В одном варианте осуществления пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность KPTTTPAPRPPTPAQTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID

NO:19). В одном варианте осуществления якорный трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранного домена CD8, CD4, CD3z, FCGR3A, NKG2D, CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 или DAP12 или его фрагмента. В предпочтительном варианте осуществления якорный трансмембранный домен представляет собой якорный домен CD8 или его фрагмент. В конкретном варианте осуществления якорный трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (SEQ ID NO:11). В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен (CSD). В одном варианте осуществления якорный трансмембранный домен антигенсвязывающего рецептора слит на С-конце с N-концом костимулирующего сигнального домена. В одном варианте осуществления костимулирующий сигнальный домен отдельно выбран из группы, состоящей из внутриклеточных доменов CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 и DAP12 или их фрагментов, описанных в данном документе выше. В предпочтительном варианте осуществления костимулирующий сигнальный домен представляет собой внутриклеточный домен CD28 или его фрагмент. В одном предпочтительном варианте осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит внутриклеточный домен CD28 или его фрагмент, который сохраняет передачу сигнала CD28. В другом предпочтительном варианте осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит внутриклеточный домен CD137 или его фрагмент, который сохраняет передачу сигнала CD137. В конкретном варианте осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит или в его состав входит SEQ ID NO:12. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор дополнительно содержит стимулирующий сигнальный домен. В одном варианте осуществления костимулирующий сигнальный домен антигенсвязывающего рецептора слит на С-конце с N-концом стимулирующего сигнального домена. В одном варианте осуществления по меньшей мере один стимулирующий сигнальный домен отдельно выбран из группы, состоящей из внутриклеточных доменов CD3z, FCGR3A и NKG2D или их фрагментов. В предпочтительном варианте осуществления костимулирующий сигнальный домен представляет собой внутриклеточный домен CD3z или его фрагмент, который сохраняет передачу сигнала CD3z. В конкретном варианте

осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит или в его состав входит SEQ ID NO:13.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор слит с репортерным белком, в частности, с GFP или его улучшенными аналогами. В
5 одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор слит на С-конце с N-концом eGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок), необязательно через пептидный линкер, описанный в данном документе. В предпочтительном варианте осуществления пептидный линкер представляет собой GEGRGSLLTCGDVEENPGP (T2A) в соответствии с SEQ ID NO:18.

10 В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор содержит якорный трансмембранный домен и внеклеточный домен, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, причем по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv, способный к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом, но не способный к
15 специфическому связыванию с немутантным исходным Fc-доменом, при этом мутантный Fc-домен содержит мутацию P329G (в соответствии с нумерацией EU). Мутация P329G снижает связывание Fcγ рецептора. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор по изобретению содержит якорный трансмембранный домен (ATD), костимулирующий сигнальный домен (CSD) и стимулирующий сигнальный домен (SSD). В одном таком варианте
20 осуществления антигенсвязывающий рецептор имеет конфигурацию scFv-ATD-CSD-SSD. В предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор имеет конфигурацию VH-VL-ATD-CSD-SSD. В более конкретном таком варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор имеет
25 конфигурацию VH-линкер-VL-линкер-ATD-CSD-SSD.

В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv, способный к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом, содержащим P329G, причем антигенсвязывающий
фрагмент содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность
30 область (CDR) тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, и по меньшей мере одну CDR легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6.

В другом конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv, способный к специфическому связыванию с

мутантным Fc-доменом, содержащим P329G, причем антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:40 и SEQ ID NO:3, и по меньшей мере одну CDR легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6.

В предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv, способный к специфическому связыванию с мутантным Fc-доменом, содержащим мутацию P329G, причем антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область (CDR H) 1 аминокислотной последовательности RYWMN (SEQ ID NO:1), CDR H2 аминокислотной последовательности EITPDSSTINYAPSLKG (SEQ ID NO:2), CDR H3 аминокислотной последовательности PYDYGAWFAS (SEQ ID NO:3), определяющую комплементарность область легкой цепи (CDR L) 1 аминокислотной последовательности RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:4), CDR L2 аминокислотной последовательности GTNKRAP (SEQ ID NO:5) и CDR L3 аминокислотной последовательности ALWYSNHWV (SEQ ID NO:6).

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий в порядке от N-конца к C-концу:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR) 1 SEQ ID NO:1, CDR 2 тяжелой цепи SEQ ID NO:2, CDR 3 тяжелой цепи SEQ ID NO:3,

(ii) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:16,

(iii) вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR 1 легкой цепи SEQ ID NO:4, CDR 2 легкой цепи SEQ ID NO:5 и CDR 3 легкой цепи SEQ ID NO:6,

(iv) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:19,

(v) якорный трансмембранный домен, в частности, якорный трансмембранный домен SEQ ID NO:11,

(vi) костимулирующий сигнальный домен, в частности, костимулирующий сигнальный домен SEQ ID NO:12, и

(vii) стимулирующий сигнальный домен, в частности, стимулирующий сигнальный домен SEQ ID NO:13.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий в порядке от N-конца к C-концу:

(i) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR) 1 SEQ ID NO:1, CDR 2 тяжелой цепи SEQ ID NO:40, CDR 3 тяжелой цепи SEQ ID NO:3,

(ii) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:16,

5 (iii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR 1 легкой цепи SEQ ID NO:4, CDR 2 легкой цепи SEQ ID NO:5 и CDR 3 легкой цепи SEQ ID NO:6,

(iv) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:19,

10 (v) якорный трансмембранный домен, в частности, якорный трансмембранный домен SEQ ID NO:11,

(vi) костимулирующий сигнальный домен, в частности, костимулирующий сигнальный домен SEQ ID NO:12, и

(vii) стимулирующий сигнальный домен, в частности, стимулирующий сигнальный домен SEQ ID NO:13.

15 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий в порядке от N-конца к C-концу:

(i) переменный домен тяжелой цепи (VH),

(ii) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:16,

20 (iii) переменный домен легкой цепи (VL), который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9,

причем домены VH и VL способны к образованию антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с Fc-доменом, содержащим аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU,

25 (iv) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:19,

(v) якорный трансмембранный домен, в частности, якорный трансмембранный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11,

30 (vi) костимулирующий сигнальный домен, в частности, костимулирующий сигнальный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, и

(vii) стимулирующий сигнальный домен, в частности, стимулирующий сигнальный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13.

5 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий в порядке от N-конца к С-концу:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8,

10 (ii) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:16,

(iii) вариабельный домен легкой цепи (VL), который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9,

(iv) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:19,

15 (v) якорный трансмембранный домен, в частности, якорный трансмембранный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11,

(vi) костимулирующий сигнальный домен, в частности, костимулирующий сигнальный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 20 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, и

(vii) стимулирующий сигнальный домен, в частности, стимулирующий сигнальный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 25 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий в порядке от N-конца к С-концу:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который является по меньшей 30 мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:41,

(ii) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:16,

(iii) вариабельный домен легкой цепи (VL), который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9,

(iv) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:19,

5 (v) якорный трансмембранный домен, в частности, якорный трансмембранный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11,

10 (vi) костимулирующий сигнальный домен, в частности, костимулирующий сигнальный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, и

15 (vii) стимулирующий сигнальный домен, в частности, стимулирующий сигнальный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий в порядке от N-конца к C-концу:

20 (i) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:44,

(ii) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:16,

25 (iii) вариабельный домен легкой цепи (VL), который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9,

(iv) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:19,

30 (v) якорный трансмембранный домен, в частности, якорный трансмембранный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11,

(vi) костимулирующий сигнальный домен, в частности, костимулирующий сигнальный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, и

(vii) стимулирующий сигнальный домен, в частности, стимулирующий сигнальный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13.

5 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий в порядке от N-конца к С-концу:

(i) переменный домен тяжелой цепи (VH), который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:126,

10 (ii) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:16,

(iii) переменный домен легкой цепи (VL), который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:127,

(iv) пептидный линкер, в частности, пептидный линкер SEQ ID NO:19,

15 (v) якорный трансмембранный домен, в частности, якорный трансмембранный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11,

(vi) костимулирующий сигнальный домен, в частности, костимулирующий сигнальный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, и

20 (vii) стимулирующий сигнальный домен, в частности, стимулирующий сигнальный домен, который является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13.

В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности: SEQ ID NO:7. В одном варианте осуществления представлен антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность: SEQ ID NO:7.

30 В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, которая является

по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности: SEQ ID NO:121. В одном варианте осуществления представлен антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность: SEQ ID NO:121.

5 В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности: SEQ ID NO:123. В одном варианте осуществления представлен антигенсвязывающий рецептор,
10 содержащий аминокислотную последовательность: SEQ ID NO:123.

В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности: SEQ ID NO:125. В одном
15 варианте осуществления представлен антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность: SEQ ID NO:125.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор слит с репортерным белком, в частности, с GFP или его улучшенными аналогами. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор слит на C-конце
20 с N-концом eGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок), необязательно через пептидный линкер, описанный в данном документе. В предпочтительном варианте осуществления пептидный линкер представляет собой GEGRGSLLTCGDVEENPGP (T2A) SEQ ID NO:18.

В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий
25 рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:129.

В предпочтительном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную
30 последовательность SEQ ID NO:129. В одном таком варианте осуществления антигенсвязывающий рецептор состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:129.

В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, которая является

по меньшей мере на приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:132.

В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:132.

5 В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий рецептор, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:132.

В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий рецептор, описанный в данном документе, причем антигенсвязывающий рецептор не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

10 Трансдуцированные клетки, способные экспрессировать антигенсвязывающие рецепторы по изобретению

Еще одним аспектом настоящего изобретения являются трансдуцированные Т-клетки, способные экспрессировать антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению. Антигенсвязывающие рецепторы, описанные в данном документе, относятся к молекулам, которые в природе не содержатся в и/или на поверхности Т-клеток и которые (эндогенно) не экспрессируются в нормальных (нетрансдуцированных) Т-клетках или на них. Таким образом, антигенсвязывающий рецептор по изобретению в Т-клетках и/или на них искусственно вводят в Т-клетки. В контексте настоящего изобретения указанные Т-клетки, предпочтительно CD8⁺ Т-клетки, могут быть выделены/получены от субъекта, подлежащего лечению, как определено в данном документе. Соответственно, описанные в данном документе антигенсвязывающие рецепторы, искусственно введенные и впоследствии представленные в и/или на поверхности указанных Т-клеток, содержат домены, содержащие один или более антигенсвязывающих фрагментов, доступных (*in vitro* или *in vivo*) для (Ig-производных) иммуноглобулинов, предпочтительно антител, в частности, для Fc-домена антител. В контексте настоящего изобретения эти искусственно введенные молекулы представлены внутри и/или на поверхности указанных Т-клеток после трансдукции (ретровирусной, лентивирусной или невирусной), описанной в данном документе ниже. Соответственно, после трансдукции Т-клетки по изобретению могут быть активированы иммуноглобулинами, предпочтительно (терапевтическими) антителами, содержащими специфические мутации в Fc-домене, описанные в данном документе, и в присутствии клеток-мишеней.

15

20

25

30

Изобретение также относится к трансдуцированным Т-клеткам, экспрессирующим антигенсвязывающий рецептор, кодируемый молекулой(ами) нуклеиновой кислоты, кодирующей(ими) антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению. Соответственно, в контексте настоящего изобретения трансдуцированная клетка может содержать молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению, или вектор по настоящему изобретению, который экспрессирует антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения термин «трансдуцированная Т-клетка» относится к генетически модифицированной Т-клетке (т. е. к Т-клетке, в которую преднамеренно введена молекула нуклеиновой кислоты). Предлагаемая в данном документе трансдуцированная Т-клетка может содержать вектор по настоящему изобретению. Предпочтительно предлагаемая в данном документе трансдуцированная Т-клетка содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению и/или вектор по настоящему изобретению. Трансдуцированная Т-клетка по изобретению может представлять собой Т-клетку, которая кратковременно или стабильно экспрессирует чужеродную ДНК (т. е. молекулу нуклеиновой кислоты, которая была введена в Т-клетку). В частности, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению, может быть стабильно интегрирована в геном Т-клетки с использованием ретровирусной или лентивирусной трансдукции. При использовании трансфекции мРНК молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению, может экспрессироваться временно. Предпочтительно, представленная в данном документе трансдуцированная Т-клетка была генетически модифицирована путем введения молекулы нуклеиновой кислоты в Т-клетку с помощью вирусного вектора (например, ретровирусного вектора или лентивирусного вектора). Соответственно, экспрессия антигенсвязывающих рецепторов может быть конститутивной, а внеклеточный домен антигенсвязывающего рецептора можно обнаружить на клеточной поверхности. Этот внеклеточный домен антигенсвязывающего рецептора может содержать полный внеклеточный домен антигенсвязывающего рецептора, определенный в данном документе, а также и

его части. Требуемый минимальный размер является антигенсвязывающим сайтом антигенсвязывающего фрагмента в антигенсвязывающем рецепторе.

Экспрессия также может быть условной или индуцируемой в случае, когда антигенсвязывающий рецептор вводится в Т-клетки под контролем индуцируемого или репрессируемого промотора. Примерами таких индуцируемых или репрессируемых промоторов может быть система транскрипции, содержащая промотор гена алкогольдегидрогеназы I (alcA) и белок-трансактиватор AlcR. Для контроля экспрессии представляющего интерес гена, связанного с промотором alcA, используются различные составы на основе сельскохозяйственного спирта. Более того, промоторные системы, чувствительные к тетрациклину, могут функционировать либо для активации, либо для подавления системы экспрессии генов в присутствии тетрациклина. Некоторые из элементов систем включают белок-репрессор тетрациклина (TetR), последовательность оператора тетрациклина (tetO) и слитый белок трансактиватора тетрациклина (tTA), который представляет собой слияние TetR и последовательности белка активации вируса простого герпеса 16 (VP16). Кроме того, можно использовать промоторы, чувствительные к стероидам, промоторы, регулируемые металлами, или промоторы, связанные с белками, связанными с патогенезом (PR).

Экспрессия может быть конститутивной или конституционной, в зависимости от используемой системы. Антигенсвязывающие рецепторы по настоящему изобретению могут быть экспрессированы на поверхности представленных в данном документе трансдуцированных Т-клеток. Внеклеточная часть антигенсвязывающего рецептора (т. е. внеклеточный домен антигенсвязывающего рецептора) может быть обнаружена на поверхности клетки, в то время как внутриклеточная часть (т.е. костимулирующий сигнальный домен(ы) и стимулирующий сигнальный домен) не обнаруживается на поверхности клетки. Обнаружение внеклеточного домена антигенсвязывающего рецептора может быть осуществлено с использованием антитела, которое специфически связывается с этим внеклеточным доменом, или с помощью мутантного Fc-домена, с которым способен связываться внеклеточный домен. Внеклеточный домен может быть обнаружен с использованием этих антител или Fc-доменов с помощью проточной цитометрии или микроскопии.

Другие клетки также могут быть трансдуцированы антигенсвязывающими рецепторами по изобретению и, таким образом, направлены против клеток-мишеней. Эти дополнительные клетки включают без ограничения В-клетки, клетки-естественные киллеры (NK), врожденные лимфоидные клетки, макрофаги, моноциты, дендритные клетки или нейтрофилы. Предпочтительно указанная иммунная клетка представляет собой лимфоцит. Запуск антигенсвязывающего рецептора по настоящему изобретению на поверхности лейкоцита делает клетку цитотоксичной по отношению к клетке-мишени в сочетании с терапевтическим антителом, содержащим мутантный Fc-домен, независимо от происхождения клетки. Цитотоксичность будет происходить независимо от стимулирующего сигнального домена или костимулирующего сигнального домена, выбранного для антигенсвязывающего рецептора, и не зависит от экзогенного поступления дополнительных цитокинов. Соответственно, трансдуцированная клетка по настоящему изобретению может представлять собой, например, CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку, $\gamma\delta$ -Т-клетку, Т-клетку естественный киллер (NK), клетку-естественный киллер (NK-клетку), инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL), миелоидную клетку или мезенхимальную стволовую клетку. Предпочтительно, представленная в данном документе трансдуцированная клетка представляет собой Т-клетку (например, аутологичную Т-клетку), более предпочтительно, трансдуцированная клетка представляет собой CD8+ Т-клетку. Соответственно, в контексте настоящего изобретения трансдуцированная клетка представляет собой CD8+ Т-клетку. К тому же в контексте настоящего изобретения трансдуцированная клетка представляет собой аутологичную Т-клетку. Соответственно, в контексте настоящего изобретения трансдуцированная клетка предпочтительно представляет собой аутологичную CD8+ Т-клетку. В дополнение к использованию аутологичных клеток (например, Т-клеток), выделенных от субъекта, настоящее изобретение также охватывает использование аллогенных клеток. Соответственно, в контексте настоящего изобретения трансдуцированная клетка также может быть аллогенной клеткой, такой как аллогенная CD8+ Т-клетка. Термин «аллогенный» относится к клеткам, полученным от неродственного донорного индивидуума/субъекта, которые являются человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA), совместимым с индивидуумом/субъектом, которого будут лечить, например, с помощью

описанного в данном документе антигенсвязывающего рецептора, экспрессирующего трансдуцированную клетку. Аутологичные клетки относятся к клеткам, которые выделяют/получают, как описано выше, от субъекта, которого лечат описанной в данном документе трансдуцированной клеткой.

5 Трансдуцированная клетка по изобретению может быть совместно трансдуцирована с другими молекулами нуклеиновой кислоты, например, молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей цитокин.

10 Настоящее изобретение также относится к способу получения трансдуцированной Т-клетки, экспрессирующей антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению, включающему шаги трансдукции Т-клетки вектором по настоящему изобретению, культивирования трансдуцированной Т-клетки в условиях, обеспечивающих экспрессию антигенсвязывающего рецептора в или на указанной трансдуцированной клетке и извлечение указанной трансдуцированной Т-клетки.

15 В контексте настоящего изобретения трансдуцированную клетку по настоящему изобретению предпочтительно получают путем выделения клеток (например, Т-клеток, предпочтительно CD8⁺ Т-клеток) от субъекта (предпочтительно пациента-человека). Способы выделения/получения клеток (например, Т-клеток, предпочтительно CD8⁺ Т-клеток) от пациентов или
20 доноров хорошо известных в данной области техники и в контексте настоящих клеток (например, Т-клеток, предпочтительно CD8⁺ Т-клеток) от пациентов или доноров, например, клетки могут быть выделены путем забора крови или удаления костного мозга. После выделения/получения клеток в качестве образца пациента (например, Т-клетки) клетки отделяют от других ингредиентов
25 образца. Известно несколько способов выделения клеток (например, Т-клеток) из образца, и они включают без ограничения, например, лейкоферез для получения клеток из образца периферической крови пациента или донора, выделение/получение клеток с использованием аппарата для сортировки клеток FACS. Выделенные/полученные Т-клетки впоследствии культивируют и
30 размножают, например, с использованием антитела к CD3, с использованием моноклональных антител к CD3 и к CD28 и/или с использованием антитела к CD3, антитела к CD28 и интерлейкина-2 (IL-2) (смотрите, например, Dudley, Immunother. 26 (2003), 332-342 или Dudley, Clin. Oncol. 26 (2008), 5233-5239).

На последующем шаге клетки (например, Т-клетки) искусственно/генетически модифицируют/трансдуцируют посредством способов, известных в данной области техники (смотрите, например, Lemoine, J Gene Med 6 (2004), 374-386). Способы трансдукции клеток (например, Т-клеток) известны в данной области и включают без ограничения, в случае трансдукции нуклеиновой кислоты или рекомбинантной нуклеиновой кислоты, например, способ электропорации, способ с использованием фосфата кальция, способ с использованием катионных липидов или липосомальный способ. Нуклеиновую кислоту, подлежащую трансдукции, можно трансдуцировать обычным образом и с высокой эффективностью с использованием имеющегося в продаже реагента для трансфекции, например, липофектамина (производства Invitrogen, номер по каталогу: 11668027). В случае использования вектора этот вектор можно трансдуцировать таким же образом, как и вышеупомянутую нуклеиновую кислоту, при условии, что вектор представляет собой плазмидный вектор (т. е. вектор, который не является вирусным вектором). В контексте настоящего изобретения способы трансдукции клеток (например, Т-клеток) включают ретровирусную или лентивирусную трансдукцию Т-клеток, невирусные векторы (например, миникольцевой вектор спящей красавицы), а также трансфекцию мРНК. «Трансфекция мРНК» относится к способу, хорошо известному специалистам в данной области техники, для кратковременной экспрессии представляющего интерес белка, такого как в данном случае антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению, в трансдуцируемой клетке. Вкратце, клетки могут быть подвергнуты электропорации с мРНК, кодирующей антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению, с использованием системы электропорации (такой как, например, Gene Pulser, Bio-Rad), а затем культивированы по стандартному протоколу культивирования клеток (например, Т-клеток), описанному выше (смотрите Zhao et al., Mol Ther. 13(1) (2006), 151–159.) Трансдуцированная клетка по изобретению может быть получена лентивирусной или, наиболее предпочтительно, ретровирусной трансдукцией.

В этом контексте в данной области техники известны подходящие ретровирусные векторы для трансдукции клеток, такие как SAMEN CMV/SRa (Clay et al., J. Immunol. 163 (1999), 507-513), LZRS-id3-IHRES (Heemskerk et al., J. Exp. Med. 186 (1997), 1597-1602), FeLV (Neil et al., Nature 308 (1984), 814-820),

SAX (Kantoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 6563-6567), pDOL (Desiderio, J. Exp. Med. 167 (1988), 372-388), N2 (Kasid et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 473-477), LNL6 (Tiberghien et al., Blood 84 (1994), 1333-1341), pZipNEO (Chen et al., J. Immunol. 153 (1994), 3630-3638), LASN (Mullen et al., Hum. Gene Ther. 7 (1996), 1123-1129), pG1XsNa (Taylor et al., J. Exp. Med. 184 (1996), 2031-2036), LCNX (Sun et al., Hum. Gene Ther. 8 (1997), 1041-1048), SFG (Gallardo et al., Blood 90 (1997) и LXSN (Sun et al., Hum. Gene Ther. 8 (1997), 1041-1048), SFG (Gallardo et al., Blood 90 (1997), 952-957), HMB-Hb-Hu (Vieillard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 11595-11600), pMV7 (Cochlovius et al., Cancer Immunol. Immunother. 46 (1998), 61-66), pSTITCH (Weitjens et al., Gene Ther 5 (1998), 1195-1203), pLZR (Yang et al., Hum. Gene Ther. 10 (1999), 123-132), pBAG (Wu et al., Hum. Gene Ther. 10 (1999), 977-982), rKat.43.267bn (Gilham et al., J. Immunother. 25 (2002), 139-151), pLGSN (Engels et al., Hum. Gene Ther. 14 (2003), 1155-1168), pMP71 (Engels et al., Hum. Gene Ther. 14 (2003), 1155-1168), pGCSAM (Morgan et al., J. Immunol. 171 (2003), 3287-3295), pMSGV (Zhao et al., J. Immunol. 174 (2005), 4415-4423) или pMX (de Witte et al., J. Immunol. 181 (2008), 5128-5136). В контексте настоящего изобретения подходящими лентивирусными векторами для трансдукции клеток (например, Т-клеток) являются, например, лентивирусный вектор PL-SIN (Hotta et al., Nat Methods. 6(5) (2009), 370-376), p156RRL-sinPPT-CMV-GFP-PRE/NheI (Campeau et al., PLoS One 4(8) (2009), e6529), pCMVR8.74 (№ по каталогу Addgene:22036), FUGW (Lois et al., Science 295(5556) (2002), 868-872), pLVX-EF1 (№ по каталогу Addgene: 64368), pLVE (Brunger et al., Proc Natl Acad Sci U S A 111(9) (2014), E798-806), pCDH1-MCS1-EF1 (Hu et al., Mol Cancer Res. 7(11) (2009), 1756-1770), pSLIK (Wang et al., Nat Cell Biol. 16(4) (2014), 345-356), pLJM1 (Solomon et al., Nat Genet. 45(12) (2013), 1428-30), pLX302 (Kang et al., Sci Signal. 6(287) (2013), rs13), pHR-IG (Xie et al., J Cereb Blood Flow Metab. 33(12) (2013), 1875-85), pRRLSIN (№ по каталогу Addgene: 62053), pLS (Miyoshi et al., J Virol. 72(10) (1998), 8150-8157), pLL3.7 (Lazebnik et al., J Biol Chem. 283(7) (2008), 11078-82), FRIG (Raissi et al., Mol Cell Neurosci. 57 (2013), 23-32), pWPT (Ritz-Laser et al., Diabetologia. 46(6) (2003), 810-821), pBOB (Marr et al., J Mol Neurosci. 22(1-2) (2004), 5-11) или pLEX (№ по каталогу Addgene: 27976).

Трансдуцированные клетки по настоящему изобретению предпочтительно выращивают в контролируемых условиях вне их природного окружения. В

частности, термин «культивирование» означает, что клетки (например, трансдуцированная(ые) клетка(и) по изобретению), происходящие от многоклеточных эукариот (предпочтительно от пациента-человека), выращивают *in vitro*. Культивирование клеток является лабораторным методом сохранения живых клеток, отделенных от исходного источника ткани. В данном документе трансдуцированную клетку по настоящему изобретению культивируют в условиях, обеспечивающих экспрессию антигенсвязывающего рецептора по настоящему изобретению в или на указанных трансдуцированных клетках. Условия, которые делают возможной экспрессию трансгена (т. е. антигенсвязывающего рецептора по настоящему изобретению), широко известны в данной области техники и включают, например, агонистические антитела к CD3 и к CD28 и добавление цитокинов, таких как интерлейкин 2 (IL-2), интерлейкин 7 (IL-7), интерлейкин 12 (IL-12) и/или интерлейкин 15 (IL-15). После экспрессии антигенсвязывающего рецептора по настоящему изобретению в культивируемой трансдуцированной клетке (например, CD8+ Т) трансдуцированную клетку извлекают (т. е. повторно экстрагируют) из культуры (т. е. из культуральной среды).

Соответственно, изобретение также охватывает трансдуцированную клетку, предпочтительно Т-клетку, в частности CD8+ Т, экспрессирующую антигенсвязывающий рецептор, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которую можно получить способом по настоящему изобретению.

Молекулы нуклеиновой кислоты

Еще одним аспектом настоящего изобретения являются нуклеиновые кислоты и векторы, кодирующие один или более антигенсвязывающих рецепторов по настоящему изобретению. Типовые молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антигенсвязывающие рецепторы по настоящему изобретению, показаны в SEQ ID NO:20. Молекулы нуклеиновых кислот по изобретению могут находиться под контролем регуляторных последовательностей. Например, могут быть использованы промоторы, усилители транскрипции и/или последовательности, которые обеспечивают индуцированную экспрессию антигенсвязывающего рецептора по изобретению. В контексте настоящего изобретения молекулы нуклеиновой кислоты экспрессируются под контролем конститутивного или индуцибельного

промотора. Подходящими промоторами являются, например, промотор CMV (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), промотор UBC (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), PGK (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), промотор EF1A (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), промотор CAGG (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), промотор SV40 (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), промотор COPIA (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), промотор ACT5C (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), промотор TRE (Qin et al., PLoS One. 5(5) (2010), e10611), промотор Oct3/4 (Chang et al., Molecular Therapy 9 (2004), S367–S367 (doi: 10.1016/j.ymthe.2004.06.904)) или промотор Nanog (Wu et al., Cell Res. 15(5) (2005), 317-24). Таким образом, настоящее изобретение также относится к вектору(ам), содержащему(им) молекулу(ы) нуклеиновой кислоты, описанную(ые) в настоящем изобретении. В данном документе термин «вектор» относится к кольцевой или линейной молекуле нуклеиновой кислоты, которая может автономно реплицироваться в клетке, в которую она была введена.

15 Специалистам в области молекулярной биологии известно много подходящих векторов, выбор которых зависит от желаемой функции и включает плазмиды, космиды, вирусы, бактериофаги и другие векторы, обычно используемые в генной инженерии. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, могут быть использованы для конструирования различных плазмид и векторов; смотрите, например, методики, описанные Sambrook et al. (loc cit.) и Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), (1994). В качестве альтернативы, полинуклеотиды и векторы по изобретению могут быть преобразованы в липосомы для доставки в клетки-мишени. Как подробно описано ниже, для выделения отдельных последовательностей ДНК использовали клонирующий вектор. Соответствующие последовательности могут быть перенесены в экспрессионные векторы, в которых требуется экспрессия конкретного полипептида. Типичные клонирующие векторы включают pBluescript SK, pGEM, pUC9, pBR322, pGA18 и pGBT9. Типичные экспрессионные векторы включают

20 рTRE, рCAL-n-EK, рESP-1, рOP13CAT.

25

30

Изобретение также относится к вектору(ам), включающему молекулу(ы) нуклеиновой кислоты, которая(ые) представляет(ют) собой регуляторную последовательность, функционально связанную с указанной молекулой(ами) нуклеиновой кислоты, кодирующей(ими) антигенсвязывающий рецептор,

определенный в данном документе. В контексте настоящего изобретения вектор может быть полицистронным. Такие регуляторные последовательности (контрольные элементы) известны специалисту в данной области техники и могут включать промотор, сплайс-кассету, кодон инициации трансляции, сайт трансляции и вставки для введения вставки в вектор(ы). В контексте настоящего изобретения указанная(ые) молекула(ы) нуклеиновой кислоты функционально связана (связываются) с указанными последовательностями контроля экспрессии, обеспечивая экспрессию в эукариотических или прокариотических клетках. Предусматривается, что указанный(е) вектор(ы) представляет(ют) собой экспрессионный(е) вектор(ы), содержащий(е) молекулу(ы) нуклеиновой кислоты, кодирующую(ие) антигенсвязывающий рецептор, определенный в данном документе. Функционально связанные относятся к сопоставлению, в котором описанные таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предполагаемым образом. Контрольную последовательность, функционально связанную с кодирующей последовательностью, лигируют таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с контрольными последовательностями. В случае, когда контрольная последовательность представляет собой промотор, для специалиста очевидно, что предпочтительно использовать двухцепочечную нуклеиновую кислоту.

В контексте настоящего изобретения указанный(е) вектор(ы) является(ются) экспрессионным(и) вектором(ами). Экспрессионный вектор представляет собой конструкт, который можно использовать для трансформации выбранной клетки и который обеспечивает экспрессию кодирующей последовательности в выбранной клетке. Экспрессионный(е) вектор(ы) может (могут), например, быть клонирующим(и) вектором(ами), бинарным(и) вектором(ами) или интегрирующим(и) вектором(ами). Экспрессия включает транскрипцию молекулы нуклеиновой кислоты предпочтительно в транслируемую мРНК. Регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в прокариотических и/или эукариотических клетках, хорошо известны специалистам в данной области техники. В случае эукариотических клеток они обычно содержат промоторы, обеспечивающие инициацию транскрипции, и необязательно поли-А-сигналы, обеспечивающие терминацию транскрипции и стабилизацию транскрипта. Возможные регуляторные элементы,

обеспечивающие экспрессию в прокариотических клетках-хозяевах, включают, например, промотор PL, lac, trp или tac в *E. coli*, а примерами регуляторных элементов, обеспечивающих экспрессию в эукариотических клетках-хозяевах, являются промотор AOX1 или GAL1 в дрожжах или промотор CMV, SV40, RSV (вирус саркомы Рауса), CMV-энхансер, SV40-энхансер или глобиновый интрон в клетках млекопитающих и других животных.

Помимо элементов, ответственных за инициацию транскрипции, такие регуляторные элементы могут также содержать сигналы терминации транскрипции, такие как сайт SV40-поли-А или сайт tk-поли-А, расположенные ниже полинуклеотида. Более того, в зависимости от используемой системы экспрессии лидерные последовательности, кодирующие сигнальные пептиды, способные направлять полипептид в клеточный компартмент или секретировать его в среду, могут быть добавлены к кодирующей последовательности указанной последовательности нуклеиновой кислоты и хорошо известны в данной области техники; смотрите также, например, прилагаемые примеры.

Лидерная(ые) последовательность(и) собрана(ы) в соответствующей фазе последовательностями трансляции, инициации и терминации и, предпочтительно, лидерной последовательностью, способной направлять секрецию транслируемого белка или его части в периплазматическое пространство или внеклеточную среду. Необязательно, гетерологичная последовательность может кодировать антигенсвязывающий рецептор, включающий N-концевой идентификационный пептид, придающий желаемые характеристики, например, стабилизацию или упрощенную очистку экспрессируемого рекомбинантного продукта; смотрите выше. В этом контексте в данной области техники известны подходящие экспрессионные векторы, такие как экспрессионный вектор кДНК Okayama-Berg pCDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-vitro gene), pEF-DHFR, pEF-ADA или pEF-neo (Raum et al. *Cancer Immunol Immunother* 50 (2001), 141-150) или pSPORT1 (GIBCO BRL).

В контексте настоящего изобретения последовательности контроля экспрессии будут представлять собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки, но также можно использовать контрольные последовательности для прокариотических клеток. Как только вектор был включен в соответствующую

клетку, эту клетку поддерживают в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей и по желанию. Дополнительные регуляторные элементы могут включать как транскрипционные, так и трансляционные энхансеры. Преимущественно, описанные выше векторы по изобретению содержат селективируемый маркер и/или маркер для подсчёта трансформантов. Селективные маркерные гены, полезные для отбора трансформированных клеток и, например, растительной ткани и растений, хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, например, устойчивость к антиметаболитам в качестве основы селекции *dhfr*, который придает устойчивость к метотрексату (Reiss, *Plant Physiol. (Life Sci. Adv.)* 13 (1994), 143-149), *npt*, который придает устойчивость к аминогликозидам неомицину, канамицину и парамицину (Herrera-Estrella, *EMBO J.* 2 (1983), 987-995), и *hygro*, который придает устойчивость к гигромицину (Marsh, *Gene* 32 (1984), 481-485). Были описаны дополнительные селективные гены, а именно *trpB*, который позволяет клеткам использовать индол вместо триптофана; *hisD*, который позволяет клеткам использовать гистинол вместо гистидина (Hartman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 8047); маннозо-6-фосфат-изомераза, которая позволяет клеткам использовать маннозу (WO 94/20627) и ODC (орнитиндекарбоксилаза), которая придает устойчивость к ингибитору орнитиндекарбоксилазы, 2-(дифторметил)-DL-орнитину, DFMO (McConlogue, 1987, In: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed.) или дезаминазу из *Aspergillus terreus*, которая придает устойчивость к бластицидину S (Tamura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (1995), 2336-2338).

Применимые поддающиеся оценке маркеры также известны специалистам в данной области техники и имеются в продаже. Преимущественно указанный маркер представляет собой ген, кодирующий люциферазу (Giacomin, *Pl. Sci.* 116 (1996), 59-72; Scikantha, *J. Vact.* 178 (1996), 121), зеленый флуоресцентный белок (Gerdes, *FEBS Lett.* 389 (1996), 44-47) или β -глюкуронидазу (Jefferson, *EMBO J.* 6 (1987), 3901-3907). Этот вариант осуществления особенно полезен для простого и быстрого скрининга клеток, тканей и организмов, содержащих указанный вектор.

Как описано выше, указанная(ые) молекула(ы) нуклеиновой кислоты может (могут) быть использована(ы) отдельно или как часть вектора(ов) для

экспрессии антигенсвязывающих рецепторов по изобретению в клетках, например, для адаптивной Т-клеточной терапии, но также и для целей генной терапии. Молекулы нуклеиновой кислоты или вектор(ы), содержащие последовательность(и) ДНК, кодирующую(ие) любой из описанных в данном документе антигенсвязывающих рецепторов, вводят в клетки, которые, в свою очередь, вырабатывают представляющий интерес полипептид. Генная терапия, основанная на введении терапевтических генов в клетки методиками *ex-vivo* или *in-vivo*, является одним из наиболее важных применений переноса генов. Подходящие векторы, способы или системы доставки генов для *in-vivo* или системы доставки генов для генной терапии *in vitro* или *in vivo* описаны в литературе и известны специалисту в данной области техники; смотрите, например, Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Verma, *Nature* 389 (1994), 239; Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Onodera, *Blood* 91 (1998), 30-36; Verma, *Gene Ther.* 5 (1998), 692-699; Nabel, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 811 (1997), 289-292; Verzeletti, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998), 2243-51; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957; US 5580859; US 5589466; или Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640. Указанная(ые) молекула(ы) нуклеиновой кислоты и вектор(ы) могут быть сконструированы для прямого введения или для введения через липосомы или вирусные векторы (например, аденовирусные, ретровирусные) в клетку. В контексте настоящего изобретения указанная клетка представляет собой Т-клетки, такие как CD8⁺ Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки, CD3⁺ Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки или естественные киллеры (NK) Т-клетки, предпочтительно CD8⁺ Т-клетки.

В соответствии с вышеизложенным, настоящее изобретение относится к способам получения векторов, в частности, плазмид, космид и бактериофагов, обычно используемых в генной инженерии, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептидную последовательность антигенсвязывающего рецептора, определенного в данном документе. В контексте настоящего изобретения указанный вектор представляет собой экспрессионный вектор и/или вектор переноса гена или вектор нацеливания. Экспрессионные векторы, полученные из вирусов, таких как ретровирусы, вирус коровьей оспы, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса или вирус

папилломы крупного рогатого скота, можно использовать для доставки указанных полинуклеотидов или вектора в целевые клеточные популяции.

Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, могут быть использованы для конструирования рекомбинантного(ых) вектора(ов); смотрите, например, методика, описанные Sambrook et al. (loc cit.), Ausubel (1989, loc cit.) или другие стандартные пособия. В качестве альтернативы, указанные молекулы нуклеиновой кислоты и векторы могут быть преобразованы в липосомы для доставки в клетки-мишени. Векторы, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению, могут быть перенесены в клетку-хозяин хорошо известными способами, которые варьируются в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекцию хлоридом кальция обычно используют для прокариотических клеток, тогда как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеток-хозяев; смотрите Sambrook выше. Указанный вектор может, среди прочего, представлять собой pEF-DHFR, pEF-ADA или pEF-нео. Векторы pEF-DHFR, pEF-ADA и pEF-нео были описаны в данной области техники, например, в Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021-7025 и Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001), 141-150.

Изобретение также относится к Т-клетке, трансдуцированной вектором, как описано в данном документе. Указанную Т-клетку можно получить путем введения по меньшей мере одного из описанных выше векторов или по меньшей мере одной из описанных выше молекул нуклеиновой кислоты в Т-клетку или ее клетку-предшественник. Присутствие указанного по меньшей мере одного вектора или по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты в Т-клетке опосредует экспрессию гена, кодирующего описанный выше антигенсвязывающий рецептор, содержащий внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, способный специфично связываться с мутантным Fc-доменом. Вектор по настоящему изобретению может быть полицистронным.

Описанная молекула(ы) нуклеиновой кислоты или вектор(ы), которые вводятся в Т-клетку или ее клетку-предшественник, могут либо интегрироваться в геном клетки, либо могут сохраняться внехромосомно.

Антигены клеток-мишеней

Как упоминалось выше, (происходящий от Ig) домен(ы) описанного в данном документе антитела, содержащий(ие) мутантный Fc-домен, в частности Fc-домен, содержащий мутацию аминокислоты P329G (согласно нумерации ЕС),
 5 содержит(ат) сайт взаимодействия с антигеном, обладающий специфичностью к молекуле поверхности клетки-мишени, например опухолеспецифический антиген, который в природе встречается на поверхности опухолевой клетки. В контексте настоящего изобретения такие антитела будут приводить трансдуцированные Т-клетки, как описано в данном документе, содержащие
 10 антигенсвязывающий рецептор по изобретению, в физический контакт с клеткой-мишенью (например, опухолевой клеткой), при этом трансдуцированная Т-клетка активируется. Активация трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению предпочтительно приводит к лизису клетки-мишени, как описано в данном документе.

15 Примеры антигенов клеток-мишеней (например, опухолевых маркеров), которые в природе встречаются на поверхности клеток-мишеней (например, опухолевых) клеток, приведены в данном документе ниже и включают, но не ограничиваются этим, FAP (белок активации фибробластов), SEA (карциноэмбриональный антиген), p95 (p95HER2), BCMA (антиген созревания
 20 В-клеток), EpCAM (молекулу адгезии эпителиальных клеток), MSLN (мезотелин), MCSP (протеогликан хондроитинсульфата меланомы), HER-1 (человеческий эпидермальный фактор роста 1), HER-2 (человеческий эпидермальный фактор роста 2), HER-3 (эпидермальный фактор роста человека 3), CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, фолатный рецептор 1 (FOLR1),
 25 антиген поверхности клеток трофобласта человека 2 (Тгор-2), раковый антиген 12-5 (CA-12-5), человеческий лейкоцитарный антиген - родственный антигену D (HLA-DR), MUC-1 (Муцин-1), A33-антиген, PSMA (простатический специфический мембранный антиген), FMS-подобную тирозинкиназу 3 (FLT-3), PSMA (специфический мембранный антиген простаты), PSCA (антиген
 30 стволовых клеток простаты), рецептор трансферрина, TNC (тенасцин), карбоангидразу IX (CA-IX) и/или пептиды, связанные с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (MHC)

Соответственно, в контексте настоящего изобретения антигенсвязывающий рецептор, как описано в данном документе, связывается с

Fc-доменом, содержащим аминокислотную мутацию P329G (согласно нумерации ЕС), т.е. терапевтическое антитело, способное специфично связываться с антигеном/маркером, который в природе встречается на поверхности опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из FAP (белка активации фибробластов), CEА (карциноэмбрионального антигена), p95 (p95HER2), BCMA (антигена созревания В-клеток), EPCAM (молекулы адгезии эпителиальных клеток), MSLN (мезотелина), MCSP (протеогликана хондроитинсульфата меланомы), HER-1 (человеческого эпидермального фактора роста 1), HER-2 (человеческого эпидермального фактора роста 2), HER-3 (эпидермального фактора роста человека 3), CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, фолатного рецептора 1 (FOLR1), антигена поверхности клеток трофобласта человека 2 (Троп-2), ракового антигена 12-5 (CA-12-5), человеческого лейкоцитарного антигена - родственного антигену D (HLA-DR), MUC-1 (Муцин-1), А33-антигена, PSMA (простатического специфического мембранного антигена), FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT-3), PSMA (специфического мембранного антигена простаты), PSCA (антигена стволовых клеток простаты), рецептора трансферрина, TNC (тенасцина), карбоангидразы IX (CA-IX) и/или пептидов, связанных с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (MHC).

Последовательность(и) членов (человеческих) антигена А33, BCMA (антигена созревания В-клеток), ракового антигена 12-5 (CA-12-5), карбоангидразы IX (CA-IX), CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CEА (карциноэмбрионального антигена), EPCAM (молекулы адгезии эпителиальных клеток), FAP (белка активации фибробластов), FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT-3), фолатного рецептора 1 (FOLR1), HER-1 (эпидермального фактора роста человека 1), HER-2 (эпидермального фактора роста человека 2), HER-3 (эпидермального фактора роста человека 3), человеческого лейкоцитарного антигена - родственного антигену D (HLA-DR), MSLN (мезотелина), MCSP (протеогликана хондроитинсульфата меланомы), MUC-1 (Муцина-1), PSMA (простатического специфического мембранного антигена), PSMA (простатического специфического мембранного антигена), PSCA (антигена стволовых клеток простаты), p95 (p95HER2), рецептора трансферрина, TNC (тенасцина), поверхностного антигена 2 трофобласта человека (Троп-2) доступны в базе данных UniProtKB/Swiss-Prot и могут быть получены по адресу

<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=reviewed%3Ayes>. Эти (белковые) последовательности также относятся к аннотированным модифицированным последовательностям. Настоящее изобретение также предлагает методики и способы, в которых используются гомологичные последовательности, а также генетические аллельные варианты и т.п. кратких последовательностей, представленных в данном документе. Предпочтительно используются такие варианты и т.п. кратких последовательностей, представленных в данном документе. Предпочтительно такие варианты являются генетическими вариантами. Специалист в данной области техники может легко определить соответствующую кодирующую область этих (белковых) последовательностей в этих записях банка данных, которые также могут содержать записи геномной ДНК, а также мРНК/кДНК. Последовательность(и) (человеческого) FAP (белка активации фибробластов) можно получить из записи Q12884 базы данных Swiss-Prot (версия записи 168, версия последовательности 5); последовательность(и) (человеческого) SEA (карциноэмбрионального антигена) можно получить из записи P06731 базы данных Swiss-Prot (версия записи 171, версия последовательности 3); последовательность(и) (человеческого) EpCAM (молекулы адгезии эпителиальных клеток) можно получить из записи P16422 базы данных Swiss-Prot (версия записи 117, версия последовательности 2); последовательность(и) (человеческого) MSLN (мезотелина) можно получить из UniProt номер записи Q13421 (номер версии 132; версия последовательности 2); последовательность(и) (человеческого) FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT-3) можно получить из записи P36888 (первичный цитируемый номер доступа) или Q13414 (вторичный цитируемый номер доступа) с номером версии 165 и версией последовательности 2; последовательности (человеческого) MCSP (протеогликана хондроитинсульфата меланомы) можно получить из UniProt номер записи Q6UVK1 (номер версии 118; версия последовательности 2); последовательность(и) (человеческого) фолатного рецептора 1 (FOLR1) можно получить из UniProt номер записи P15328 (первичный цитируемый номер доступа) или Q53EW2 (вторичный цитируемый номер доступа) с номером версии 153 и версией последовательности 3; последовательность(и) (человеческого) поверхностного антигена 2 трофобласта человека (Trop-2) можно получить из UniProt номер записи P09758 (первичный цитируемый номер доступа) или Q15658 (вторичный цитируемый номер доступа) с номером версии

172 и версией последовательности 3; последовательность(и) (человеческого) PSCA (антигена стволовых клеток простаты) можно получить из UniProt номер записи O43653 (первичный цитируемый номер доступа) или Q6UW92 (вторичный цитируемый номер доступа) с номером версии 134 и версией последовательности 1; последовательность(и) (человеческого) HER-1 (рецептора эпидермального фактора роста) можно получить из записи P00533 (версия записи 177, версия последовательности 2); последовательность(и) (человеческого) HER-2 (рецептора тирозин-протеинкиназы erbB-2) можно получить из записи P04626 (версия записи 161, версия последовательности 1); последовательность(и) (человеческого) HER-3 (рецептора тирозин-протеинкиназы erbB-3) можно получить из записи P21860 базы данных Swiss-Prot (версия записи 140, версия последовательности 1); последовательность(и) (человеческого) CD20 (В-лимфоцитарного антигена CD20) можно получить из записи P11836 (версия записи 117, версия последовательности 1); последовательность(и) (человеческого) CD22 (В-лимфоцитарного антигена CD22) можно получить из записи P20273 (версия записи 135, версия последовательности 2); последовательность(и) (человеческого) CD33 (В-лимфоцитарного антигена CD33) можно получить из записи P20138 (версия записи 129, версия последовательности 2); последовательность(и) (человеческого) CA-12-5 (Муцина-16) можно получить из записи Q8WXI7 (версия записи 66, версия последовательности 2); последовательность(и) (человеческого) HLA-DR можно получить из записи Q29900 (версия записи 59, версия последовательности 1); последовательность(и) (человеческого) MUC-1 (муцина-1) можно получить из записи P15941 (версия записи 135, версия последовательности 3); последовательность(и) (человеческого) A33 (антигена A33 клеточной поверхности) можно получить из записи Q99795 (версия записи 104, версия последовательности 1); последовательность(и) (человеческого) PSMA (глутамата карбоксипептидазы 2) можно получить из записи Q04609 (версия записи 133, версия последовательности 1), последовательность(и) (человеческого) рецептора трансферрина можно получить из записей Q9UP52 (версия записи 99, версия последовательности 1) и P02786 (версия записи 152, версия последовательности 2) базы данных Swiss-Prot; последовательность (человеческого) TNC (тенасцина) можно получить из записи P24821 (версия записи 141, версия последовательности 3); или последовательность(и)

(человеческого) СА-IX (карбоангидразы IX) можно получить из записи Q16790 (версия записи 115, версия последовательности 2).

В предпочтительном варианте осуществления антиген клетки-мишени выбран из группы, состоящей из белка активации фибробластов (FAP), карциноэмбрионального антигена (CEA), мезотелина (MSLN), CD20, фолатного рецептора 1 (FOLR1) и тенасцина (TNC).

Антитела, способные специфично связываться с любым из вышеупомянутых антигенов клеток-мишеней, могут быть получены с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, таких как иммунизация иммунной системы млекопитающих и/или фаговой дисплей с использованием рекомбинантных библиотек.

Антитела, используемые согласно настоящему изобретению, содержат Fc-домен, содержащий мутацию P329G (согласно нумерации ЕС). Мутация P329G снижает связывание Fc-рецептора и/или эффекторную функцию и может использоваться в сочетании с другими Fc-мутациями, которые влияют на связывание и/или эффекторную функцию. Соответственно, в дополнительных вариантах осуществления мутантный Fc-домен антител проявляет уменьшенную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или уменьшенную эффекторную функцию по сравнению с нативным Fc-доменом IgG₁. В одном таком варианте осуществления мутантный Fc-домен (или антитело, содержащее указанный мутированный Fc-домен) демонстрирует менее 50%, предпочтительно менее 20%, более предпочтительно менее 10% и наиболее предпочтительно менее 5% аффинности связывания с Fc-рецептором по сравнению с нативным Fc-доменом IgG₁ (или антителом, содержащим нативный Fc-домен IgG₁) и/или менее 50%, предпочтительно менее 20%, более предпочтительно менее 10% и наиболее предпочтительно менее 5% эффекторную функцию по сравнению с нативным Fc-доменом IgG₁ (или антителом, содержащим нативный Fc-домен IgG₁). В одном варианте осуществления мутантный Fc-домен (или антитело, содержащее указанный мутированный Fc-домен) по существу не связывается с Fc-рецептором и/или не индуцирует эффекторную функцию. В конкретном варианте осуществления Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор. В одном варианте осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc-рецептор человека. В одном варианте осуществления Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления Fc-рецептор

представляет собой активирующий Fc γ -рецептор человека, более конкретно Fc γ RIIIa, Fc γ RI или Fc γ RIIa человека, наиболее конкретно Fc γ RIIIa человека. В одном варианте осуществления эффекторная функция представляет собой одну или более функций, выбранных из группы КЗЦ, АЗКЦ, АЗКФ и секреции цитокинов. В конкретном варианте осуществления эффекторной функцией представляет собой АЗКЦ. В одном варианте осуществления мутантный Fc-домен проявляет существенно измененную аффинность связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) по сравнению с нативным Fc-доменом IgG₁. В одном варианте осуществления антитело, содержащее мутантный Fc-домен, демонстрирует менее 20%, конкретно менее 10%, более конкретно менее 5% аффинности связывания с Fc-рецептором по сравнению с антителом, содержащим несконструированный Fc-домен. В конкретном варианте осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc γ -рецептор. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc-рецептор человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc γ -рецептор человека, более конкретно Fc γ RIIIa, Fc γ RI или Fc γ RIIa человека, наиболее конкретно Fc γ RIIIa человека. Предпочтительно снижается связывание с каждым из этих рецепторов. В некоторых вариантах осуществления также снижается аффинность связывания с компонентом комплемента, в частности аффинность связывания с C1q.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен антитела является мутантным, чтобы иметь пониженную эффекторную функцию по сравнению с немутантным Fc-доменом. Снижение эффекторной функции может включать, но не ограничиваться этим, одно или более из следующих действий: снижение комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), снижение антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ), снижение антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ), снижение секреции цитокинов, снижение опосредованного иммунными комплексами поглощения антигена антигенпрезентирующими клетками, снижение связывания с НК-клетками, снижение связывания с макрофагами, снижение связывания с моноцитами, снижение связывания с полиморфно-ядерными клетками, снижение прямой передачи сигналов, индуцирующей апоптоз, снижение перекрестного связывания антител, связанных с мишенью, снижение созревания дендритных

клеток или снижение праймирования Т-клеток. В одном варианте осуществления сниженная эффекторная функция представляет собой одну или более функций, выбранных из группы сниженной КЗЦ, сниженной АЗКЦ, сниженного АЗКФ и сниженной секреции цитокинов. В конкретном варианте осуществления

5 сниженная эффекторная функция представляет собой сниженную АЗКЦ. В одном варианте осуществления сниженная АЗКЦ составляет менее 20% от АЗКЦ, индуцированной несконструированным Fc-доменом (или антителом, содержащим несконструированный Fc-домен).

В одном варианте осуществления аминокислотная мутация, которая

10 снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором и/или эффекторной функцией, представляет собой аминокислотную замену. В одном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы E233, L234, L235, N297 и P331. В более конкретном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену в

15 положениях L234 и/или L235. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A и L235A. В одном таком варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG₁, в частности Fc-домен IgG₁ человека. В более конкретном варианте осуществления дополнительная аминокислотная замена представляет собой E233P, L234A,

20 L235A, L235E, N297A, N297D или P331S. В предпочтительном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотные мутации L234A, L235A и P329G («P329G LALA») согласно нумерации ЕС. В одном таком варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG₁, в частности Fc-домен IgG₁ человека. Комбинация аминокислотных замен «P329G LALA» почти

25 полностью устраняет связывание Fcγ-рецептором (а также компонентом) Fc-домена IgG₁ человека, как описано в публикации РСТ № WO 2012/130831, полностью включенной в данный документ посредством ссылки. WO 2012/130831 также описывает способы получения таких мутантных Fc-доменов и способы определения их свойств, таких как связывание Fc-рецептора или

30 эффекторные функции.

В некоторых вариантах осуществления исключено N-гликозилирование Fc-домена. В одном из таких вариантов осуществления Fc-домен содержит аминокислотную мутацию в положении N297, в частности аминокислотную

мутацию, заменяющую аспарагин аланином (N297A) или аспарагиновой кислотой (N297D).

В дополнение к Fc-доменам, описанным выше и в публикации PCT № WO 2012/130831, Fc-домены со сниженным связыванием с Fc-рецептором и/или эффекторной функцией также включают домены с мутацией одного или более остатков Fc-домена 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (патент США № 6737056). Такие Fc мутанты включают Fc мутанты с мутациями в двух или более положениях аминокислот 265, 269, 270 и 297, включая так называемый Fc мутант «DANA» с мутацией остатков 265 и 297 на аланин (патент США №7332581).

Мутантные Fc домены можно получить путем делеции, замены, вставки или модификации аминокислоты с использованием генетических или химических методов, хорошо известных в данной области техники. Генетические способы могут включать сайт-специфический мутагенез кодирующей последовательности ДНК, ПЦР, генный синтез и т.п. Правильные изменения нуклеотидов можно проверить, например, путем секвенирования.

Связывание с Fc-рецепторами можно легко определить, например, с помощью ELISA или с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием стандартного оборудования, такого как прибор BIAcore (GE Healthcare), а с Fc-рецепторами, например, можно получить путем рекомбинантной экспрессии. Альтернативно, аффинность связывания Fc-доменов или активирующих клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих Fc-домен для Fc-рецепторов, можно оценить с использованием клеточных линий, которые, как известно, экспрессируют определенные Fc-рецепторы, такие как NK-клетки человека, экспрессирующие рецептор Fcγ3a.

Эффекторную функцию Fc-домена или антитела, содержащего Fc-домен, можно измерить способами, известными в данной области техники. Другие примеры анализов *in vitro* для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5500362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) и Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); патенте США № 5821337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). В качестве альтернативы можно использовать способы нерадиоактивного анализа (смотрите, например, анализ нерадиоактивной

цитотоксичности АСТП™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, Калифорния); и анализ нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, Мэдисон, Висконсин)). Эффекторные клетки, полезные для таких анализов, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и клетки-естественные киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно АЗКЦ-активность представляющей интерес молекулы можно оценить *in vivo*, например, на животной модели, такой как описанная в Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

В некоторых вариантах осуществления снижается связывание Fc-домена с компонентом комплемента, в частности с C1q. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, в которых Fc-домен сконструирован таким образом, чтобы он имел пониженную эффекторную функцию, указанная сниженная эффекторная функция включает снижение КЗЦ. Анализы связывания C1q могут быть проведены для определения того, способно ли антитело связывать C1q и, следовательно, обладает ли активностью КЗЦ. Смотрите, например, ELISA связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно провести анализ КЗЦ (смотрите, например, Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); и Cragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Наборы

Дополнительным аспектом настоящего изобретения являются наборы, содержащие или состоящие из нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенсвязывающий рецептор по изобретению, и/или клеток, предпочтительно Т-клеток для трансдукции/трансдуцированных антигенсвязывающими рецепторами по изобретению и, необязательно, антитело/антитела, содержащие мутантный Fc-домен, причем антигенсвязывающий рецептор способен специфично связываться с мутантным Fc-доменом.

Соответственно, предложен набор, содержащий:

(А) трансдуцированную Т-клетку, способную экспрессировать антигенсвязывающий рецептор по изобретению; и

(В) антитело, которое связывается с антигеном клетки-мишени, и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

Дополнительно предложен набор, содержащий:

(А) выделенный полинуклеотид и/или вектор, кодирующий антигенсвязывающий рецептор по изобретению; и

(В) антитело, которое связывается с антигеном клетки-мишени, и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

Наборы по настоящему изобретению могут содержать трансдуцированные Т-клетки, выделенные полинуклеотиды и/или векторы и одно или более антител, содержащих Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G согласно нумерации ЕС. В конкретных вариантах осуществления антитело представляет собой терапевтическое антитело, например, опухолеспецифическое антитело, описанное выше в данном документе. Опухоспецифические антигены известны в данной области техники и описаны выше. В контексте настоящего изобретения антитело вводят до, одновременно или после введения трансдуцированных Т-клеток, экспрессирующих антигенсвязывающий рецептор по изобретению. Наборы, согласно настоящему изобретению, содержат трансдуцированные Т-клетки или полинуклеотиды/векторы для создания трансдуцированных Т-клеток. В этом контексте трансдуцированные Т-клетки являются универсальными Т-клетками, поскольку они не специфичны для данной опухоли, но могут быть нацелены на любую опухоль с помощью терапевтического антитела, содержащего мутантный Fc-домен. В данном документе представлены примеры антител, содержащих Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G, согласно нумерации ЕС (например, SEQ ID NO: 102-115), однако любое антитело, содержащее Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G согласно нумерации ЕС, может быть использовано согласно изобретению и включено в представленные в данном документе наборы.

В конкретном варианте осуществления антитело, содержащее мутантную Fc-область, способно специфично связываться с CD20 и содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:102 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:103. В одном варианте осуществления антитело, содержащее мутантную Fc-область, способно специфично связываться с FAP и содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:104 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:105. В одном варианте осуществления антитело, содержащее мутантную Fc-область, способно специфично связываться с CEA и содержит

последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:106 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:107, последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:108 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:109, последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:110 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:111 или
5 последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:112 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:113. В дополнительных вариантах осуществления антитело, содержащее мутантную Fc-область, способно специфично связываться с тенаксином (TNC) и содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:114 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:115.

10 В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен набор, содержащий трансдуцированную Т-клетку, способную экспрессировать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 («VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD»), или в качестве альтернативы набор содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7
15 (например, набор содержит полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID NO:20), объединенную с антителом, содержащим тяжелую цепь SEQ ID NO:102 и легкую цепь SEQ ID NO:103. Такой набор можно использовать для лечения CD20-положительного рака.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен
20 набор, содержащий трансдуцированную Т-клетку, способную экспрессировать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 («VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD»), или в качестве альтернативы набор содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7
25 (например, набор содержит полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID NO:20), объединенную с антителом, содержащим тяжелую цепь SEQ ID NO:104 и легкую цепь SEQ ID NO:105. Такой набор можно использовать для лечения FAP-положительного рака.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен
30 набор, содержащий трансдуцированную Т-клетку, способную экспрессировать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 («VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD»), или в качестве альтернативы набор содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7
(например, набор содержит полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID NO:20), объединенную с антителом, содержащим тяжелую цепь SEQ ID

NO:106 и легкую цепь SEQ ID NO:107. В качестве альтернативы предложен набор, содержащий трансдуцированную Т-клетку, способную экспрессировать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 («VH3VL1-CD28ATD-CD137CSD-CD3zSSD»), или, в качестве альтернативы, набор содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 (например, набор содержит полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID NO:20), объединенную с антителом, содержащим тяжелую цепь SEQ ID NO:108 и легкую цепь SEQ ID NO:109. Такой набор можно использовать для лечения FAP-положительного рака. В качестве альтернативы предложен набор, содержащий трансдуцированную Т-клетку, способную экспрессировать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 («VH3VL1-CD28ATD-CD137CSD-CD3zSSD»), или, в качестве альтернативы, набор содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 (например, набор содержит полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID NO:20), объединенную с антителом, содержащим тяжелую цепь SEQ ID NO:110 и легкую цепь SEQ ID NO:111. В другом варианте осуществления предложен набор, содержащий трансдуцированную Т-клетку, способную экспрессировать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 («VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD»), или, в качестве альтернативы, набор содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 (например, набор содержит полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID NO:20), объединенную с антителом, содержащим тяжелую цепь SEQ ID NO:112 и легкую цепь SEQ ID NO:113. Такие наборы можно использовать для лечения CEA-положительного рака.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен набор, содержащий трансдуцированную Т-клетку, способную экспрессировать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 («VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD»), или в качестве альтернативы набор содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 (например, набор содержит полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID NO:20), объединенную с антителом, содержащим тяжелую цепь SEQ ID NO:114 и легкую цепь SEQ ID NO:115. Такой набор можно использовать для лечения TNC-положительного рака.

Кроме того, части набора по изобретению могут быть упакованы индивидуально во флаконы или бутылки или в комбинации в контейнеры или многоконтейнерные единицы. Кроме того, набор по настоящему изобретению может включать (закрытую) систему инкубации клеток в мешке, в которой 5 клетки пациента, предпочтительно Т-клетки, описанные в данном документе, могут быть трансдуцированы антигенсвязывающим рецептором(ами) по изобретению и инкубированы в условиях GMP (надлежащая производственная практика, описанная в руководящих принципах надлежащей производственной практики, опубликованных Европейской комиссией на условиях 10 http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/index_en.htm). Кроме того, набор по настоящему изобретению включает (закрытую) систему инкубации клеток в мешке, в которой выделенные/полученные Т-клетки пациента могут быть трансдуцированы антигенсвязывающим рецептором(ами) по изобретению и инкубированы в условиях GMP. Кроме того, в контексте настоящего 15 изобретения набор может также содержать вектор, кодирующий антигенсвязывающий рецептор(ы), как описано в данном документе. Набор по настоящему изобретению можно с успехом использовать, среди прочего, для осуществления способа по изобретению, а также в различных приложениях, упомянутых в данном документе, например, в качестве исследовательских 20 инструментов или медицинских инструментов. При изготовлении наборов предпочтительно следуют стандартные процедуры, которые известны специалисту в данной области техники.

В этом контексте клетки, полученные от пациента, предпочтительно Т-клетки, можно трансдуцировать антигенсвязывающим рецептором по 25 изобретению, способным специфично связываться с мутантным Fc-доменом, как описано в данном документе, с использованием набора, описанного выше. Внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, способный специфично связываться с мутантным Fc-доменом, в природе не встречается в Т-клетках или на них. Соответственно, клетки, полученные от пациента, 30 трансдуцированные наборами по изобретению, приобретут способность специфического связывания с мутантным Fc-доменом антитела, например терапевтическое антитело станет способным индуцировать элиминацию/лизис клеток-мишеней посредством взаимодействия с терапевтическим антителом, содержащим мутантный Fc-домен, при этом терапевтическое антитело способно

связываться с встречающимся в природе опухолеспецифическим антигеном (который эндогенно экспрессируется) на поверхность опухолевой клетки. Связывание внеклеточного домена антигенсвязывающего рецептора, описанного в данном документе, активирует эту Т-клетку и приводит ее в физический контакт с опухолевой клеткой через терапевтическое антитело, содержащее мутантный Fc-домен. Нетрансдуцированные или эндогенные Т-клетки (например, CD8⁺ Т-клетки) не способны связываться с мутантным Fc-доменом терапевтического антитела, содержащего мутантный Fc-домен. Трансдуцированные Т-клетки, экспрессирующие антигенсвязывающий рецептор, содержащий внеклеточный домен, способный специфично связываться с мутантным Fc-доменом, остаются незатронутыми терапевтическим антителом, не содержащим мутации в Fc-домене, описанном в данном документе. Соответственно, Т-клетки, экспрессирующие молекулу антигенсвязывающего рецептора по изобретению, обладают способностью лизировать клетки-мишени в присутствии антитела, содержащего мутации в Fc-домене, описанном в данном документе, *in vivo* и/или *in vitro*. Соответствующие клетки-мишени включают клетки, экспрессирующие поверхностную молекулу, т.е. опухолеспецифический антиген, встречающийся в природе на поверхности опухолевой клетки, который распознается по меньшей мере одним, предпочтительно двумя, связывающимися доменами терапевтического антитела, описанного в данном документе. Такие поверхностные молекулы охарактеризованы ниже.

Лизис клетки-мишени можно обнаружить способами, известными в данной области техники. Соответственно, такие способы включают, среди прочего, физиологические анализы *in vitro*. Такие физиологические анализы могут контролировать гибель клеток, например, по потере целостности клеточной мембраны (например, анализ йодида пропидия на основе FACS, анализ притока трипанового синего, фотометрический анализ высвобождения фермента (LDH), радиометрический анализ высвобождения ⁵¹Cr, флуориметрический анализ высвобождения европия и анализ высвобождения кальцеина AM). Дополнительные анализы включают мониторинг жизнеспособности клеток, например, с помощью фотометрических анализов MTT, ХТТ, WST-1 и анализа аламарового синего, радиометрического анализа включения ³H-Thd, клоногенного анализа, измеряющего активность деления клеток, и флуориметрического анализа с родамином123, измеряющим

митохондриальный трансмембранный градиент. Кроме того, апоптоз можно контролировать, например, с помощью анализа воздействия фосфатидилсерина на основе FACS, теста TUNEL на основе ELISA, анализа активности каспаз (фотометрического, флуориметрического или на основе ELISA) или анализа измененной морфологии клеток (сморщивания, вздутия мембран).

Терапевтическое применение и способы лечения

Молекулы или конструкторы (например, антигенсвязывающие рецепторы, трансдуцированные Т-клетки и наборы), представленные в данном документе, особенно полезны в медицинских учреждениях, в частности, для лечения рака. Например, опухоль можно лечить с помощью трансдуцированной Т-клетки, экспрессирующей антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению в сочетании с терапевтическим антителом, которое связывается с целевым антигеном на опухолевой клетке и содержит мутированный домен Fc (т.е. Fc-домен, содержащий мутацию P329G согласно нумерации EU). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий рецептор, трансдуцированная Т-клетка или набор используются при лечении рака, в частности рака эпителиального, эндотелиального или мезотелиального происхождения и рака крови.

Опухолеспецифичность лечения обеспечивается терапевтическим антителом, которое связывается с антигеном клетки-мишени, причем антитело вводится ранее, одновременно с или после введения трансдуцированных Т-клеток, экспрессирующих антигенсвязывающий рецептор по изобретению. В этом контексте трансдуцированные Т-клетки являются универсальными Т-клетками, поскольку они не специфичны для данной опухоли, но могут быть нацелены на любую опухоль в зависимости от специфичности терапевтического антитела, используемого согласно изобретению.

Рак может быть раком/карциномой эпителиального, эндотелиального или мезотелиального происхождения или раком крови. В одном варианте осуществления рак/карцинома выбрана из группы, состоящей из рака желудочно-кишечного тракта, рака поджелудочной железы, холангиоцеллюлярного рака, рака легких, рака молочной железы, рака яичника, рака кожи, рака полости рта, рака желудка, рака шейки матки, В и Т-клеточной лимфомы, миелоидного лейкоза, рака яичника, лейкоза, лимфатического лейкоза, носоглоточной карциномы, рака толстой кишки, рака предстательной

железы, почечно-клеточного рака, рака головы и шеи, рака кожи (меланомы), рака мочеполовой системы, например, рака яичка, рака яичника, эндотелиального рака, рака шейки матки и рака почки, рака желчных протоков, рака пищевода, рака слюнных желез и рака щитовидной железы или других
5 опухолевых заболеваний, таких как гематологические опухоли, глиомы, саркомы или остеосаркомы.

Например, опухолевые заболевания и/или лимфомы можно лечить с помощью специфического конструкта, направленного против этого(их) медицинского(их) показания(й). Например, рак желудочно-кишечного тракта,
10 рак поджелудочной железы, холангиоцеллюлярный рак, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак кожи и/или рак полости рта можно лечить с помощью антитела, направленного против (человеческого) EpCAM (как опухолеспецифического антигена, встречающегося в природе на поверхности опухолевой клетки).

15 Рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, холангиоцеллюлярный рак, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак кожи и/или рак полости рта можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против HER1,
20 предпочтительно HER1 человека. Кроме того, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, холангиоцеллюлярный рак, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак кожи, глиобластому и/или рак полости рта можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против MCSP,
25 предпочтительно MCSP человека. Рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, холангиоцеллюлярный рак, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак кожи, глиобластому и/или рак полости рта можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до,
30 одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против FOLR1, предпочтительно FOLR1 человека. Рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, холангиоцеллюлярный рак, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак кожи, глиобластому и/или рак полости рта можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему

изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против Tgp-2, предпочтительно Tgp-2 человека. Рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, холангиоцеллюлярный рак, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак
5 кожи, глиобластома и/или рак полости рта можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против PSCA, предпочтительно PSCA человека. Рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, холангиоцеллюлярный рак, рак легкого, рак
10 молочной железы, рак яичника, рак кожи, глиобластома и/или рак полости рта можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против EGFRvIII, предпочтительно EGFRvIII человека. Рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы,
15 холангиоцеллюлярный рак, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак кожи, глиобластома и/или рак полости рта можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против MSLN, предпочтительно MSLN человека. Рак желудка, рак молочной
20 железы и/или рак шейки матки можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против HER2, предпочтительно HER2 человека. Рак желудка и/или рак легкого можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых
25 до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против HER3, предпочтительно HER3 человека. В-клеточную лимфому и/или Т-клеточную лимфому можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против CD20, предпочтительно CD20
30 человека. В-клеточную лимфому и/или Т-клеточную лимфому можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против CD22, предпочтительно CD22 человека. Миелоидный лейкоз можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению,

вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против CD33, предпочтительно CD33 человека. Рак яичника, рак легкого, рак молочной железы и/или рак желудочно-кишечного тракта можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению,

5 вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против CA12-5, предпочтительно CA12-5 человека. Рак желудочно-кишечного тракта, лейкоз и/или носоглоточную карциному можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению,

10 вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против HLA-DR, предпочтительно HLA-DR человека. Рак толстой кишки, рак молочной железы, рак яичника и/или рак поджелудочной железы можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против MUC-1, предпочтительно MUC-1 человека. Рак

15 толстой кишки можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против A33, предпочтительно A33 человека. Рак предстательной железы можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до,

20 одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против PSMA, предпочтительно PSMA человека. Рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, холангиоцеллюлярный рак, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак кожи и/или рак полости рта можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых

25 до, одновременно или после введения терапевтического средства, направленного против рецептора трансферрина, предпочтительно рецептора трансферрина человека. Рак поджелудочной железы, рак легкого и/или рак молочной железы можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против рецептора трансферрина, предпочтительно

30 рецептора трансферрина человека. Рак почки можно лечить с помощью трансдуцированных Т-клеток по настоящему изобретению, вводимых до, одновременно или после введения терапевтического антитела, направленного против CA-IX, предпочтительно CA-IX человека.

Изобретение также относится к способу лечения заболевания, а именно злокачественного заболевания, такого как рак эпителиального, эндотелиального или мезотелиального происхождения и/или рак крови. В контексте настоящего изобретения указанным субъектом является человек.

5 В контексте настоящего изобретения конкретный способ лечения заболевания включает шаги:

(a) выделение Т-клеток, предпочтительно CD8⁺ Т-клеток, от субъекта;

(b) трансдукцию указанных выделенных Т-клеток, предпочтительно CD8⁺ Т-клеток, антигенсвязывающим рецептором, описанным в данном документе; и

10 (c) введение трансдуцированных Т-клеток, предпочтительно CD8⁺ Т-клеток, указанному субъекту.

В контексте настоящего изобретения указанные трансдуцированные Т-клетки, предпочтительно CD8⁺ Т-клетки, и/или терапевтические антитела/антитела вводятся совместно указанному субъекту посредством внутривенной инфузии.

Более того, в контексте настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания, включающий шаги:

(a) выделение Т-клеток, предпочтительно CD8⁺ Т-клеток, от субъекта;

20 (b) трансдукцию указанных выделенных Т-клеток, предпочтительно CD8⁺ Т-клеток, антигенсвязывающим рецептором, описанным в данном документе;

(c) необязательно совместную трансдукцию указанных выделенных Т-клеток, предпочтительно CD8⁺ Т-клеток, с Т-клеточным рецептором;

25 (d) распространение Т-клеток, предпочтительно CD8⁺ Т-клеток, с помощью антител к CD3 и к CD28; и

(e) введение трансдуцированных Т-клеток, предпочтительно CD8⁺ Т-клеток, указанному субъекту.

30 Вышеупомянутый шаг (d) (относящийся к шагу размножения Т-клеток, таких как TIL, с помощью антител к CD3 и/или к CD28) также может быть выполнен в присутствии (стимулирующих) цитокинов, таких как интерлейкин-2 и /или интерлейкин-15 (IL-15). В контексте настоящего изобретения вышеупомянутый шаг (d) (относящийся к шагу размножения Т-клеток, таких как TIL, с помощью антител к CD3 и/или к CD28) также может быть выполнен в

присутствии интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-7 (IL-7) и/или интерлейкина-21 (IL-21).

Кроме того, способ лечения включает введение антитела, используемого согласно настоящему изобретению. Указанное антитело можно вводить до, 5 одновременно или после введения трансдуцированных Т-клеток. В контексте настоящего изобретения введение трансдуцированных Т-клеток будет осуществляться посредством внутривенной инфузии. В контексте настоящего изобретения трансдуцированные Т-клетки выделяют/получают от субъекта, подлежащего лечению.

10 Изобретение дополнительно предусматривает протоколы совместного введения с другими соединениями, например, молекулами, способными обеспечивать сигнал активации для иммунных эффекторных клеток, для пролиферации клеток или для стимуляции клеток. Указанная молекула может быть, например, дополнительным первичным сигналом активации для Т-клеток 15 (например, дополнительной костимулирующей молекулой: молекулами семейства B7, Oх40L, 4.1 BBL, CD40L, анти-CTLA-4, анти-PD-1) или другим цитокином интерлейкином (например, IL-2).

Композиция по изобретению, описанная выше, также может представлять собой диагностическую композицию, дополнительно содержащую, 20 необязательно, средства и способы обнаружения.

Композиции

Кроме того, в изобретении предложены композиции (лекарственные средства), содержащие молекулу(ы) антитела с мутированным (мутированными) Fc-доменом(ами) и/или трансдуцированную(ые) Т-клетку(и), содержащую(ие) 25 антигенсвязывающий рецептор по изобретению, и/или молекулу(ы) нуклеиновой кислоты и вектор(ы), кодирующие антигенсвязывающие рецепторы согласно изобретению. Кроме того, в изобретении предложены наборы, содержащие одну или более указанных композиций. В контексте настоящего изобретения композиция представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно 30 содержащую, необязательно, подходящие композиции носителя, стабилизаторов и/или наполнителей. Соответственно, в контексте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция (лекарственное средство), которая содержит молекулу антитела, содержащую мутантный Fc-домен, как определено в данном документе, которую следует вводить в комбинации с

трансдуцированной Т-клеткой, содержащей антигенсвязывающий рецептор, как описано в данном документе, и/или композицию, содержащую указанную трансдуцированную Т-клетку, причем указанную молекулу антитела следует вводить до, одновременно или после введения трансдуцированных Т-клеток, содержащих антигенсвязывающий рецептор по изобретению.

Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором компоненты схемы лечения должны вводиться субъекту. Соответственно, фармацевтическая композиция/лекарственное средство, описанное в данном документе, включает введение антитела, как определено в данном документе, до, одновременно или после введения трансдуцированных Т-клеток, содержащих антигенсвязывающий рецептор по настоящему изобретению. Используемый в данном документе термин «в комбинации» также не ограничивает время между введением антитела, как определено в данном документе выше, и трансдуцированных Т-клеток, содержащих антигенсвязывающий рецептор, как определено в данном документе. Таким образом, если два компонента не вводятся одновременно с/параллельно, введения могут быть разделены на 1 минуту, 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов или 72 часа или любую подходящую разницу во времени, легко определяемую специалистом в данной области техники и/или описанную в данном документе.

В контексте настоящего изобретения термин «в комбинации» также охватывает ситуацию, когда антитело, определенное в данном документе, и трансдуцированные Т-клетки, содержащие антигенсвязывающий рецептор согласно изобретению, предварительно инкубируются вместе перед введением субъекту. Таким образом, два компонента могут быть предварительно инкубированы перед введением, например, в течение 1 минуты, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут или 1 часа или в течение любого подходящего времени, легко определяемого специалистом в данной области техники. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к схеме лечения, при которой антитело, как определено в данном документе, и трансдуцированные Т-клетки, содержащие антигенсвязывающий рецептор, как определено в данном документе, должны вводиться одновременно с/параллельно. В контексте настоящего изобретения антитело, определенное в

данном документе, можно вводить после введения трансдуцированных Т-клеток, содержащих антигенсвязывающий рецептор.

Кроме того, используемый в данном документе термин «в комбинации» не ограничивает раскрытые схемы лечения введением антитела, как определено в данном документе, и трансдуцированных Т-клеток, предпочтительно CD8+ Т-клеток, содержащих антигенсвязывающий рецептор по изобретению в непосредственной последовательности (т.е. введение одного из двух компонентов с последующим (через определенный интервал времени) введением другого без введения и/или практического применения какого-либо другого протокола лечения между ними). Таким образом, настоящие схемы лечения также включают отдельное введение молекулы антитела, как определено в данном документе, и трансдуцированных Т-клеток, предпочтительно CD8+ Т-клеток, содержащих антигенсвязывающий рецептор согласно изобретению, причем введения разделены одним или более протоколами лечения, необходимыми и/или подходящими для лечения или профилактики заболевания или его симптома. Примеры таких протоколов интервенционного лечения включают, но не ограничиваются этим, введение обезболивающих лекарственных средств; введение химиотерапевтических препаратов, хирургическое лечение заболевания или его симптома. Соответственно, схемы лечения, раскрытые в данном документе, включают введение антитела, как определено в данном документе, и трансдуцированных Т-клеток, предпочтительно CD8+ Т-клеток, содержащих антигенсвязывающий рецептор, как определено в данном документе, вместе с отсутствием, одним или более чем одним протоколом лечения, подходящим для лечения или профилактики заболевания или его симптома, как описано в данном документе или как известно в данной области техники.

В частности, предусматривается, что указанную(ые) фармацевтическую композицию(и)/лекарственное средство(а) следует вводить пациенту посредством инфузии или инъекции. В контексте настоящего изобретения трансдуцированные Т-клетки, содержащие антигенсвязывающий рецептор, как описано в данном документе, следует вводить пациенту посредством инфузии или инъекции. Введение подходящих композиций/лекарственных средств может осуществляться различными способами: внутривенным, внутрибрюшинным, подкожным, внутримышечным, местным или внутрикожным.

Фармацевтическая композиция/лекарственное средство по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают забуференные фосфатом солевые растворы, воду, эмульсии, такие как масляные/водные эмульсии, различные типы смачивающих средств, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие такие носители, могут составляться хорошо известными стандартными методиками. Эти фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Схема дозирования будет определяться лечащим врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в области медицины, дозы для любого пациента зависят от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные препараты, которые вводят параллельно. Как правило, схема регулярного введения фармацевтической композиции должна находиться в диапазоне от 1 мкг до 5 г единиц в день. Однако более предпочтительная дозировка для непрерывной инфузии может находиться в диапазоне от 0,01 мкг до 2 мг, предпочтительно от 0,01 мкг до 1 мг, более предпочтительно от 0,01 мкг до 100 мкг, еще более предпочтительно от 0,01 мкг до 50 мкг и наиболее предпочтительно от 0,01 мкг до 10 мкг единиц на килограмм массы тела в час. Особенно предпочтительные дозировки указаны ниже. Прогресс можно отслеживать с помощью периодической оценки. Дозировки будут варьироваться, но предпочтительная доза для внутривенного введения ДНК составляет приблизительно от 10^6 до 10^{12} копий молекулы ДНК.

Композиции по изобретению можно вводить местно или системно. Введение, как правило, будет парентеральным, например, внутривенным; трансдуцированные Т-клетки также можно вводить непосредственно в целевой участок, например, с помощью катетера в участок в артерии. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные среды.

Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучие масла. Внутривенные носители включают вещества для восполнения жидкости и питательных веществ, вещества для восполнения электролитов (например, на основе декстрозы Рингера) и т. п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные вещества, антиоксиданты, хелатирующие средства, инертные газы и т. п. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать белковые носители, такие как, например, сывороточный альбумин или иммуноглобулин, предпочтительно происходящие от человека. Предусматривается, что фармацевтическая композиция по изобретению может содержать в дополнение к белковым конструктам антител, или молекулам нуклеиновых кислот, или векторам, кодирующим их (описанным в данном изобретении), и/или клетки, другие биологически активные средства, в зависимости от предполагаемого использования фармацевтической композиции. Такими средствами могут быть лекарственные препараты, действующие на желудочно-кишечную систему, лекарственные препараты, действующие как цитостатики, лекарственные препараты, предотвращающие гиперурикемию, лекарственные препараты, ингибирующие иммунные реакции (например, кортикостероиды), лекарственные препараты, действующие на систему кровообращения, и/или средства, такие как костимулирующие молекулы Т-клеток или цитокины, известные в данной области техники.

Эти и другие варианты осуществления раскрыты и охватываются описанием и примерами настоящего изобретения. Дополнительную литературу, касающуюся любого из антител, способов, применений и соединений, которые будут применяться в соответствии с настоящим изобретением, можно получить из публичных библиотек и баз данных, с применением, например, электронных устройств. Например, общедоступная база данных «Medline», доступная в Интернете, может использоваться, например, по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/medline.html>. Дополнительные базы данных и адреса, такие как <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobiogen.fr/>, http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html, <http://www.tigr.org/>, известны специалистам в данной области техники и могут быть также получены с применением, например, <http://www.lycos.com>.

Типовые последовательности**Таблица 2. Типовые аминокислотные последовательности VH3VL1****P329G-CAR:****Определение CDR в соответствии с Кабатом**

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
VH3 CDR H1	RYWMN	1
VH3 CDR H2	EITPDSSTINYAPSLKG	2
VH3 CDR H3	PYDYGAWFAS	3
VL1 CDR L1	RSSTGAVTTSNYAN	4
VL1 CDR L2	GTNKRAP	5
VL1 CDR L3	ALWYSNHWW	6
Слияние VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPG KGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGAQPEDEAEYYCALWYSNHWWVFGGGTKLTVLGGGGSLKP TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSL VITKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	7
VH3 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPG KGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSS	8
VL1 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPD HLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGAQPEDEAE YYCALWYSNHWWVFGGGTKLTVL	9
scFv VH3VL1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPG KGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGAQPEDEAEYYCALWYSNHWWVFGGGTKLTVL	10
CD8ATD	IYIWAPLAGTCGVLLLSL VIT	11
CD137CSD	KRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	12
CD3zSSD	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	13
CD28ATD-CD137CSD-CD3zSSD	KPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITKRGRKLL YIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	14
eGFP	VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFKFS AMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGLDNLVNIELKIDF KEDGNLGHKLEYNYSNHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIED GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRD HMLVLEFVTAAGITLGMDEL YK	15
линкер (G4S)4	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	16
линкер G4S	GGGS	17
линкер T2A	GEGRGSLLTCGDVEENPGP	18

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
CD8stalk	KPTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CD	19

Таблица 3. Типовые последовательности ДНК VH3 x VL1 P329G-CAR:

Конструкт	Последовательность ДНК	SEQ ID NO
Слияние VH3VL1- CD28ATD- CD137CSD- CD3zSSD	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCCTGGTGCAGCCC GGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTACCT TCAGCAGGTAAGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCA AGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGAGATCACCCCCGACAGCAGCA CCATCAACTACGCCCCAGCCTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAG CCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAAGTGCAGATGAACAG CTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACCGTGAGCAGCGGAGGGGGCGGAAGTGGTGGCGGG GGAAGCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGCGGATCTCAGGCC GTGGTGACCCAGGAGCCAGCCTGACCGTGAGCCCCGGCGGC ACCGTGACCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGGGCGCCGTGACC ACCAGCAACTACGCCAAGTGGGTGCAGGAGAAGCCCGACCAC CTGTTACCCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCC GGCACCCCCGCCAGGTTACAGCGGCAGCCTGCTGGGCGGCAAG GCCGCCCTGACCCTGAGCGGCGCCAGCCCCGAGGACGAGGCC GAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCG GCGGCGGCACCAAGCTGACCGTCTTAGGAGGGGGCGGATCCT TGAAGCCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGG CGCCCCACCATCGCGTGCAGCCCCCTGTCCTTGCAGGAGGC GTGCCCGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCT GGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGG ACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCAAACGGG GCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAG ACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAA GTTACAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCA GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGA GTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGAT GGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTA CAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACG ATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA CGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC	20
VH3	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCCTGGTGCAGCCC GGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTACCT TCAGCAGGTAAGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCA AGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGAGATCACCCCCGACAGCAGCA CCATCAACTACGCCCCAGCCTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAG CCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAAGTGCAGATGAACAG CTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACCGTGAGCAGC	21
VL1	CAGGCCGTGGTGACCCAGGAGCCAGCCTGACCGTGAGCCCC GGCGGCACCGTGACCCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCC GTGACCACCAGCAACTACGCCAAGTGGGTGCAGGAGAAGCCC GACCACCTGTTACCCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGG GCCCCCGGCACCCCCGCCAGGTTACAGCGGCAGCCTGCTGGGCG GCAAGGCCGCCCTGACCCTGAGCGGCGCCAGCCCCGAGGACG AGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGT	22

Конструкт	Последовательность ДНК	SEQ ID NO
	GTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTCCTA	
scFv VH3VL1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCCTGGTGCAGCCC GGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCT TCAGCAGGTAAGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCA AGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGAGATCACCCCGACAGCAGCA CCATCAACTACGCCCCCAGCCTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAG CCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGCC CTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACCGTGAGCAGCGGAGGGGGCGGAAGTGGTGGCGGG GGAAGCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGCGGATCTCAGGCC GTGGTGACCCAGGAGCCAGCCTGACCGTGAGCCCCGCGCGC ACCGTGACCCGTACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGACC ACCAGCAACTACGCCAAGTGGGTGCAGGAGAAGCCCGACCAC CTGTTCAACCGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCC GGCACCCCGCCAGGTTACGCGGCAGCCTGCTGGGCGGCAAG GCCGCCCTGACCCTGAGCGGCGCCAGCCCGAGGACGAGGCC GAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTTCG GCGGCGGCACCAAGCTGACCGTCCTA	23
CD8ATD	ATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTC TCCTGTCACTGGTTATCACC	24
CD137CSD	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA TTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGT AGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG	25
CD3zSSD	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAG CAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGA AGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGAC CCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA GGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAG GGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAG GACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC	26
CD28ATD- CD137CSD- CD3zSSD	ATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTC TCCTGTCACTGGTTATCACCAACGGGGCAGAAAGAACTCCT GTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACT CAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAA GAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA GACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGA AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAA GATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGC GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGT CTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC AGGCCCTGCCCCCTCGC	27
элемент T2A	TCCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTG GAGGAGAATCCCGGCCCTAGG	28
eGFP	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATC CTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGC GTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG ACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCT GGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTCTT CAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAG TCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCT TCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGT TCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA TCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGG AGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACA	29

Конструкт	Последовательность ДНК	SEQ ID NO
	AGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACA ACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGC AGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACA ACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCA ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGC CGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA	
Слияние VH3VL1- CD28ATD- CD137CSD- CD3zSSD GFP	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCGGCTGGTGCAGCCC GGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTACCT TCAGCAGGTAAGTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCA AGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGAGATCACCCCCGACAGCAGCA CCATCAACTACGCCCCCAGCCTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACTACTGCAGATGAACAG CCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGCC CTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACCGTGAGCAGCGGAGGGGGCGGAAGTGGTGGCGGG GGAAGCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGCGGATCTCAGGCC GTGGTGACCCAGGAGCCCAGCCTGACCGTGAGCCCCGGCGGC ACCGTGACCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGACC ACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAGCCCGACCAC CTGTTACCCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCC GGCACCCCCGCCAGGTTACAGCGGCAGCCTGCTGGGCGGCAAG GCCGCCCTGACCCTGAGCGGCGCCAGCCCGAGGACGAGGCC GAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTG GCGGCGGCACCAAGCTGACCGTCCTAGGAGGGGGCGGATCCT TGAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGG CGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGC GTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGT GGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCCTGGCCGGG ACTTGTGGGGTCTTCTCTGTCACTGGTTATCACCAAACGGG GCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAG ACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAA GTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCA GAACCAGTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGA GTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGAT GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTA CAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACG ATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA CGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGAATTCTCC GGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAG GAGAATCCCGGCCCTAGGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC ACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTA AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCG GCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGAC CTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGA CCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACC GCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACA TCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACG TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGA ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC TCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCC CCGTGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCG CCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCT GCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGAC	30

Конструкт	Последовательность ДНК	SEQ ID NO
	GAGCTGTACAAG	

Таблица 4. Типовые аминокислотные последовательности VL1VH3 P329G-CAR:

Определение CDR в соответствии с Кабатом

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
VH3 CDR H1	смотрите Таблицу 2	1
VH3 CDR H2	смотрите Таблицу 2	2
VH3 CDR H3	смотрите Таблицу 2	3
VL1 CDR L1	смотрите Таблицу 2	4
VL1 CDR L2	смотрите Таблицу 2	5
VL1 CDR L3	смотрите Таблицу 2	6
Слияние VL1VH3-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGSLKPTTPAPRPPT	31
VH3 VH	смотрите Таблицу 2	8
VL1 VL	смотрите Таблицу 2	9
scFv VL1VH3	MLLVTSLLLCELPHPAFLIPAAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSS	32
CD8ATD	смотрите Таблицу 2	11
CD137CSD	смотрите Таблицу 2	12
CD3zSSD	смотрите Таблицу 2	13
CD28ATD-CD137CSD-CD3zSSD	смотрите Таблицу 2	14
eGFP	смотрите Таблицу 2	15
линкер (G4S) ₄	смотрите Таблицу 2	16
линкер G4S	смотрите Таблицу 2	17
линкер T2A	смотрите Таблицу 2	18

5

Таблица 5. Типовые последовательности ДНК VL1VH3 P329G-CAR:

Конструкт	Последовательность ДНК	SEQ ID NO
Слияние VL1VH3-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD	CAGGCCGTGGTGACCCAGGAGCCAGCCTGACCGTGAGCCCCGGCGGCACCGTGACCCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGACCACCCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAGCCCAGCCACCTGTTACCCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCCGGCACCCCGCCAGGTTGAGCGGCAGCCTGCTGGGCGGCAAGGCCGCCCTGACCCTGAGCGGCGCCAGCCGAGGACGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTCCTAGGAGGGGGCGGAAGTGGTGGCGGGGAAGCGGCGGGGTGGCAGCGGAGGGG	33

Конструкт	Последовательность ДНК	SEQ ID NO
	GCGGATCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCGGCCTGG TGCAGCCCGGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCG GCTTCACCTTCAGCAGGTAAGTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGC CCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGAGATCACCCCGA CAGCAGCACCATCAACTACGCCCCCAGCCTGAAGGGCAGGTT CACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCA GATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAAGTACTG CGCCAGGCCCTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGC CAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGAGGGGGCGGATCC TTGAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCG GCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGG CGTGCCGGCCAGCGGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGC TGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGG GACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCAAACGG GGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGA GACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCC GATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGA AGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCC AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG AGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGA TGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGT ACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTG AGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCAC GATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCT ACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC	
VH3	смотрите Таблицу 3	20
VL1	смотрите Таблицу 3	21
CD8ATD	смотрите Таблицу 3	24
CD137CSD	смотрите Таблицу 3	25
CD3zSSD	смотрите Таблицу 3	26
CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD	смотрите Таблицу 3	27
элемент T2A	смотрите Таблицу 3	28
eGFP	смотрите Таблицу 3	29
Слияние VL1VH3- CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD- eGFP	CAGGCCGTGGTGACCCAGGAGCCCAGCCTGACCGTGAGCCCC GGCGGCACCGTGACCCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCC GTGACCACCAGCAACTACGCCAAGTGGGTGCAGGAGAAGCCC GACCACCTGTTACCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGG GCCCCCGGCACCCCGCCAGGTTAGCAGGCGAGCCTGCTGGGCG GCAAGGCCGCCCTGACCCCTGAGCGGCGCCCAGCCCCGAGGACG AGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGT GTTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTCCTAGGAGGGGGCGG AAGTGGTGGCGGGGAAGCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGG GCGGATCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCGGCCTGG TGCAGCCCGGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCG GCTTCACCTTCAGCAGGTAAGTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGC CCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGAGATCACCCCGA CAGCAGCACCATCAACTACGCCCCCAGCCTGAAGGGCAGGTT CACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCA GATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAAGTACTG CGCCAGGCCCTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGC CAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGAGGGGGCGGATCC TTGAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCG GCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGG CGTGCCGGCCAGCGGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGC TGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGG GACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCAAACGG	34

Конструкт	Последовательность ДНК	SEQ ID NO
	GGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGA GACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCC GATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGA AGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG AGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGA TGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGT ACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTG AGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCAC GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCT ACGACGCCCTTACATGCAAGGCCCTGCCCCCTCGCGAATTCTC CGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA GGAGAATCCCGGCCCTAGGGTGTAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT CACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGT AAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGA TGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACC GGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGA CCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAG ACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAC ATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAAC GTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAG CTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGC CCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCG CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCC TGCTGGAGTTCGTGACCCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGA CGAGCTGTACAAG	

Таблица 6. Типовые антитела к P329G

Определение CDR в соответствии с Кабатом

huIgG1 к P329G (M-1.7.24)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYTPSLKD	35
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	4
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHWV	6
VH	EVKLLSEGGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSR YWMNWVRQAPGKG LEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMIKVRSEDTA LYYCVRPYDYGAWFASWGQGLVTVSA	36
VL	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHL FTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAAL TITGAQTEDEAIYFCAL WYSNHWVFGGGTKLTVL	37
HC	EVKLLSEGGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSR YWMNWVRQAPGKG LEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMIKVRSEDTA LYYCVRPYDYGAWFASWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYS	38

	KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	
LC	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDL FTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCAL WYSNHWFVGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPSSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPECS	39
huIgG1 κ P329G (VH1VL1)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYTPSLKG	40
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	4
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHV	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRYWMNWVRQAPGKG LEWVGEITPDSSTINYTPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGLTVTVSS	41
VL	QAVVTQEPLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDL FTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCA LWYSNHWFVGGGTKLTVL	9
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRYWMNWVRQAPGKG LEWVGEITPDSSTINYTPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	42
LC	QAVVTQEPLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDL FTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCA LWYSNHWFVGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPSSSEELQANKATLVC CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPECS	43
huIgG1 κ P329G (VH2VL1)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYAPSLKG	2
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	4
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHV	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRYWMNWVRQAPGKG LEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCVRPYDYGAWFASWGQGLTVTVSS	44
VL	QAVVTQEPLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDL FTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCA LWYSNHWFVGGGTKLTVL	9
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRYWMNWVRQAPGKG LEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCVRPYDYGAWFASWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHT TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLN NGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	45
LC	QAVVTQEPLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDL FTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCA	43

	LWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPFPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
huIgG1 κ P329G (VH3VL1)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYAPSLKG	2
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	4
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHWV	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPGKG LEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTSS	8
VL	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHL FTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCA LWYSNHWVFGGGTKLTVL	9
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPGKG LEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	46
LC	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHL FTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCA LWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPFPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	43
huIgG1 κ P329G (VH4VL1)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYADSVKG	47
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	4
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHWV	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFFSRYWMNWVRQAPGKG LEWVSEITPDSSTINYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTSS	48
VL	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHL FTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCA LWYSNHWVFGGGTKLTVL	9
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFFSRYWMNWVRQAPGKG LEWVSEITPDSSTINYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	49
LC	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHL FTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCA LWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPFPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	43

huIgG1 κ P329G (VH1VL2)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYTPSLKG	40
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	4
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHWV	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDPSRYWMNWVRQAPGKG LEWVGEITPDSSTINYTPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGTLVTVSS	41
VL	QAVVTQEPSTLVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQA FTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCA LWYSNHWVFGGGTKLTVL	50
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDPSRYWMNWVRQAPGKG LEWVGEITPDSSTINYTPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKK VEPKSCDKTHT CPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP	42
LC	QAVVTQEPSTLVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQKPGQA FTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCA LWYSNHWVFGGGTKLTVLGLQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKS HRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	51
huIgG1 κ P329G (VH1VL3)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYTPSLKG	40
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	52
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHWV	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDPSRYWMNWVRQAPGKG LEWVGEITPDSSTINYTPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGTLVTVSS	41
VL	QAVVTQEPSTLVSPGGT VTLTCGSSTGAVTTSNYANWFQKPGQA PRTLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCA LWYSNHWVFGGGTKLTVL	53
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDPSRYWMNWVRQAPGKG LEWVGEITPDSSTINYTPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKK VEPKSCDKTHT CPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP	42
LC	QAVVTQEPSTLVSPGGT VTLTCGSSTGAVTTSNYANWFQKPGQA PRTLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCA LWYSNHWVFGGGTKLTVLGLQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKS HRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	54

Таблица 7. Вариант Fc IgG1 P329G

Fc huIgG1 P329G	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSDGSEFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLS LSP	55
--------------------	--	----

Таблица 8

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQID NO
CD27 человека	ATGGCGCGCCCGCATCCGTGGTGGCTGTGCGTGCTGGGCACCCT GGTGGGCTGAGCGCGACCCCGGCGCCGAAAAGCTGCCCGGAA CGCCATTATTGGGCGCAGGGCAAACCTGTGCTGCCAGATGTGCGA ACCGGGCACCTTTCTGGTGAAGATTGCGATCAGCATCGCAAAG CGGCGCAGTGCATCCGTGCATTCCGGGCGTGAGCTTTAGCCCG GATCATCATACCCGCCCGCATTGCGAAAAGCTGCCGCCATTGCAA CAGCGGCTGTGGTGCGCAACTGCACCATTACCGCGAACGCG GAATGCGCGTGCCGCAACGGCTGGCAGTGCCGCGATAAAGAAT GCACCGAATGCGATCCGCTGCCGAACCCGAGCCTGACCGCGCG CAGCAGCCAGGCGCTGAGCCCGCATCCGCAGCCGACCCATCTG CCGTATGTGAGCGAAATGCTGGAAGCGCGCACCGCGGGCCATA TGCAGACCCTGGCGGATTTTCGCCAGCTGCCGCGCGCACCCCTG AGCACCCATTGGCCGCGCAGCGCAGCCTGTGCAGCAGCGATT TATTCGCATTCTGGTGATTTTTAGCGGCATGTTTCTGGTGTTTAC CCTGGCGGGCGCGCTGTTTCTGCATCAGCGCCGCAAATATCGCA GCAACAAAGGCGAAAGCCCGGTGGAACCGGCGGAACCGTGCCA TTATAGCTGCCCGCGCGAAGAAGAAGGCAGCACCATTCGATTC AGGAAGATTATCGCAAACCGGAACCGGCGTGCGAGCCCG	56
CD27 человека	MARPHPWWLCLVGLTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCQMC EPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSPDHHTRPHCESCRHCNS GLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQ ALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWP PQRSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPV EPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP	57
Мышиный CD27	ATGGCGTGGCCGCGCCGTATTGGCTGTGCATGCTGGGCACCCT GGTGGGCTGAGCGCGACCCGCGCCGAACAGCTGCCCGGAT AAACATTATTGGACCGGCGGCGGCTGTGCTGCCGCATGTGCGA ACCGGGCACCTTTTTGTGAAGATTGCGAACAGGATCGCACCG CGGCGCAGTGCATCCGTGCATTCCGGGACACAGCTTTAGCCCG GATTATCATACCCGCCCGCATTGCGAAAAGCTGCCGCCATTGCAA CAGCGGCTTTCTGATTCGCAACTGCACCGTGACCGCGAACGCGG AATGCAGCTGCAGCAAAAAGTGGCAGTGCCGCGATCAGGAATG CACCGAATGCGATCCGCGCTGAACCCGGCGCTGACCCGCCAG CCGAGCGAAACCCCGAGCCCGCAGCCGCCCGCCGACCCATCTGC CGCATGGCACCGAAAAACCGAGCTGGCCGCTGCATCGCCAGCT GCCGAACAGCACCGTGTATAGCCAGCGCAGCAGCCATCGCCCG CTGTGCAGCAGCGATTGCATTCGCATTTTTGTGACCTTTAGCAG CATGTTTCTGATTTTTGTGCTGGGCGCGATTCTGTTTTTTCATCA GCGCCGCAACCATGGCCCGAACGAAGATCGCCAGGCGGTGCCG GAAGAACCGTGCCCGTATAGCTGCCCGCGCGAAGAAGAAGGCA GCGCGATTCCGATTCAGGAAGATTATCGCAAACCGGAACCGGC GTTTTATCCG	58
Мышиный CD27	MAWPPPYWLCMLGTLVGLSATLAPNSCPDKHYWTGGGLCCRM EPGTFFVKDCEQDRATAQCDPCIPGTSFSPDYHTRPHCESCRHCNS GFLIRNCTVTANAECSCSNWQCRDQECTECDPPLNPALTRQPS PSPQPPPTHLPHGTEKPSWPLHRQLPNSTVYSQRSSHRPLCSSDCIRI FVTFSSMFLIFVLGAILFFHQRRNHGPNEDRQAVPEEPCPYSCPRE	59

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQID NO
	EGSAIQEDYRKPEPAF YP	
CD28 человека	ATGCTGCGCCTGCTGCTGGCGCTGAACCTGTTTCCGAGCATTCA GGTGACCGGCAACAAAATTCTGGTGAACAGAGCCCGATGCTG GTGGCGTATGATAACGCGGTGAACCTGAGCTGCAAATATAGCT ATAACCTGTTTAGCCGCGAATTCGCGCGAGCCTGCATAAAGGC CTGGATAGCGCGGTGGAAGTGTGCGTGGTGTATGGCAACTATA GCCAGCAGCTGCAGGTGTATAGCAAAACCGGCTTTAACTGCGAT GGCAAACCTGGGCAACGAAAGCGTGACCTTTTATCTGCAGAACCT GTATGTGAACCAGACCGATATTTATTTTTGCAAAAATTGAAGTGA TGTATCCGCCGCCGTATCTGGATAACGAAAAAAGCAACGGCAC CATTATTCATGTGAAAGGCAAACATCTGTGCCCGAGCCCGCTGT TTCCGGCCCCGAGCAAACCGTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGC GGCGTGTGGCGTGTATAGCCTGCTGGTGAACCGTGGCGTTTAT TATTTTTGGGTGCGCAGCAAACGCGAGCCGCTGCTGCATAGCG ATTATATGAACATGACCCCGCGCCCGGGCCCCGACCCGCAA ACATTATCAGCCGTATGCGCCCGCGCGGATTTTGCGGCGTATC GCAGC	60
CD28 человека	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYN LFSREFRASLHKGLDSA VECVVYGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKL GNESVTFYLQNL YVNQTDIYFKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK GKHLCPSPFPGPSKPFWVL VVVGVLACYSLL VTVAFIIFWVRSK RSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	61
Мышиный CD28	ATGACCCTGCGCCTGCTGTTTCTGGCGCTGAACCTTTTTTAGCGTG CAGGTGACCGAAAACAAAATTCTGGTGAACAGAGCCCGCTGC TGGTGGTGGATAGCAACGAAGTGAGCCTGAGCTGCCGCTATAG CTATAACCTGCTGGCGAAAGAATTCGCGCGAGCCTGTATAAAG GCGTGAACAGCGATGTGGAAGTGTGCGTGGGCAACGGCAACTT TACCTATCAGCCGCAGTTTCGCAGCAACGCGGAATTTAACTGCG ATGGCGATTTTGATAACGAAACCGTGACCTTTCGCCTGTGGAAC CTGCATGTGAACCATAACCGATATTTATTTTTGCAAAAATTGAATTT ATGTATCCGCCGCCGTATCTGGATAACGAACGCAGCAACGGCA CCATTATTCATATTAAGAAAAACATCTGTGCCATAACCCAGAGC AGCCCGAAACTGTTTTGGGCGCTGGTGGTGGTGGCGGGCGTGCT GTTTTGCTATGGCCTGCTGGTGAACCGTGGCGCTGTGCGTGATTT GGACCAACAGCCGCCGCAACCGCCTGCTGCAGAGCGATTATAT GAACATGACCCCGCGCCCGCCCGGCGCTGACCCGCAAACCGTAT CAGCCGTATGCGCCCGCGCGGATTTTGCGGCGTATCGCCCG	62
Мышиный CD28	MTLRLFLALNFFSVQVTENKILVKQSPLL VVDSNEVSLSCRYSYN LLAKEFRASLYKGVNSDVEVC VGNGNFTYQPQFRSNAEFNCDGDF DNETVTFRL WNLHVNHTDIYFKIEFMYPYLDNERSNGTIIHIKE KHLCHTQSSPKLFWAL VVVAGVLFYGLL VTVALCVIWTNSRRNR LLQSDYMNMTPRRPLTRKPYQPYAPARDFAA YRP	63
CD137 человека	ATGGGAAACAGCTGTTACAACATAGTAGCCACTCTGTTGCTGGT CCTCAACTTTGAGAGGACAAGATCATTGCAGGATCCTTGTAAGTA ACTGCCAGCTGGTACATTCTGTGATAATAACAGGAATCAGATT TGCAGTCCCTGTCCTCCAAATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGACA AAGGACCTGTGACATATGCAGGCAGTGTAAGGTGTTTTCAGG ACCAGGAAGGAGTGTTCCTCCACCAGCAATGCAGAGTGTGACT GCACTCCAGGGTTTCACTGCCTGGGGGCAGGATGCAGCATGTGT GAACAGGATTGTAACAAGGTCAAGAAGTACAAAAAAGGTT GTAAGACTGTTGCTTTGGGACATTTAACGATCAGAAACGTGGC ATCTGTCGACCCTGGACAAACTGTTCTTTGGATGGAAAGTCTGT GCTTGTGAATGGGACGAAGGAGAGGGACGTGGTCTGTGGACCA TCTCCAGCCGACCTCTCTCCGGGAGCATCCTCTGTGACCCCGCC TGCCCCTGCGAGAGAGCCAGGACACTCTCCGCAGATCATCTCCT TCTTTCTTGCCTGACGTCGACTGCGTGTGCTTTCCTGCTGTTCT TCCTCACGCTCCGTTTCTCTGTTGTTAAACGGGGCAGAAAGAAA CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAAC	64

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQID NO
	TACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAA GAAGAAGGAGGATGTGAACTGTGA	
CD137 человека	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICS PCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGF HCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPW TNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPG HSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFVSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	65
Мышиный CD137	ATGGGCAACAACCTGCTATAACGTGGTGGTGATTGTGCTGCTGCT GGTGGGCTGCGAAAAAGTGGGCGCGGTGCAGAACAGCTGCGAT AACTGCCAGCCGGGCACCTTTTGCCGCAAATATAACCCGGTGTG CAAAAGCTGCCC GCCGAGCACCTTTAGCAGCATTGGCCGGCCAG CCGAACTGCAACATTTGCCGCGTGTGCGCGGGCTATTTTCGCTT TAAAAAATTTTGCAGCAGCACCCATAACGCGGAATGCGAATGC ATTGAAGGCTTTCATTGCCTGGGCCCAGTGCACCCGCTGCGA AAAAGATTGCCGCCCGGGCCAGGAACTGACCAAACAGGGCTGC AAAACCTGCAGCCTGGGCACCTTTAACGATCAGAACGGCACCCG GCGTGTGCCGCCCGTGGACCAACTGCAGCCTGGATGGCCGCA CGTGCTGAAAACCGGCACCACCGAAAAAGATGTGGTGTGCGGC CCGCCGGTGGTGTGAGCTTTAGCCCAGCACCCATTAGCGTGAC CCCGGAAGGCGGCCCGGGCGGCCATAGCCTGCAGGTGCTGACC CTGTTTCTGGCGCTGACCAGCGCGCTGCTGCTGGCGCTGATTTT ATTACCCTGCTGTTTAGCGTGCTGAAATGGATTCGCAAAAAATT TCCGCATATTTTAAACAGCCGTTTAAAAAAACCACCGGCGCGG CGCAGGAAGAAGATGCGTGCAGCTGCCGCTGCCCGCAGGAAGA AGAAGGCGGGCGGGCGGCTATGAACTG	66
Мышиный CD137	MGNNCYNVVVIVLLL VGCEKVGAVQNSCDNCQPGTFCRKYNPVC KSCPPSTFSSIGGQPNICRVCAGYFRFKKFCSSTHNAECECIEGF HCLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGT FNDQNGTG VCRP WTNCSLDGRSVLKTGTTEKDVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGG HSLQVLTFLALTSALLLALIFITLLFSVLKWIRKKFPHIFKQPFKKT TGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGGYEL	67
OX40 человека	ATGTGCGTGGGCGCGCGCCGCTGGGCCGCGGCCCGTGC GCGG CGCTGCTGCTGCTGGGCTGGGCTGAGCACCGTGACCGGCCTG CATTGCGTGGGCGATACCTATCCGAGCAACGATCGCTGCTGCCA TGAATGCCGCCCGGGCAACGGCATGGTGTGAGCCGCTGCAGCCG AGCCAGAACACCGTGTGCGCCCGTGC GGGCCCGGGCTTTTATAA CGATGTGGTGTGAGCAGCAAACCGTGC AAACCGTGCACCTGGTGC AACCTGCGCAGCGGCAGCGAACGCAAACAGCTGTGCACCGCGA CCCAGGATACCGTGTGCCGCTGCCGCGGGCACCCAGCCGCTG GATAGCTATAAACCGGGCGTGGATTGCGCGCCGTGCCCGCCGG GCCATTTTAGCCCGGGCGATAACCAGGCGTGCAAACCGTGGAC CAACTGCACCCTGGCGGGCAAACATAACCTGCAGCCGGCGAGC AACAGCAGCGATGCGATTTGCGAAGATCGCGATCCGCCGGCGA CCCAGCCG CAGGAAACCCAGGGCCCGCGGCGCGCCCGATTAC CGTGCAGCCGACCGAAGCGTGGCCGCGCACCAGCCAGGGCCCG AGCACCCGCCCGGTGGAAGTGCCGGGCGGCGCGCGGTGGCGG CGATTCTGGGCTGGGCTGGTGTGCTGGGCTGCTGGGCCCCGCTG GCGATTCTGCTGGCGCTGTATCTGCTGCGCCGCGATCAGCGCCT GCCGCCGATGCGCATAAACCGCCGGGCGGCGGCAGCTTTCGC ACCCCGATT CAGGAAGAACAGGCGGATGCGCATAGCACCCCTGG CGAAAATT	68
OX40 человека	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCC ECRPGNGMVSRSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPKPCTWCNL RSGSERKQLCTATQDTVCRRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFS PGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPATQPQET QGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVL GLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGFSFRTPIQEEQADAH	69

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQID NO
	STLAKI	
Мышиный ОХ40	ATGTATGTGTGGGTGCAGCAGCCGACCGCGCTGCTGCTGCTGGC GCTGACCCTGGGCGTGACCAGCGCGCCGCTGAACTGCGTGAAA CATACTATCCGAGCGGCCATAAATGCTGCCGCGAATGCCAGCC GGGCCATGGCATGGTGAGCCGCTGCGATCATAACCGCGATACCC TGTGCCATCCGTGCGAAACCGGCTTTTATAACGAAGCGGTGAAC TATGATACCTGCAAACAGTGCACCCAGTGCAACCATCGCAGCG GCAGCGAACTGAAACAGAAGTGCACCCGACCCAGGATACCGT GTGCCGCTGCCGCCCGGGCACCCAGCCGCGCCAGGATAGCGGC TATAAACTGGGCGTGGATTGCGTGCCGTGCCCGCCGGGCCATTT TAGCCCGGGCAACAACAGGCGTGCAAACCGTGGACCAACTGC ACCCGTGAGCGGCAAAACAGACCCGCCATCCGGCGAGCGATAGCC TGGATGCGGTGTGCGAAGATCGCAGCCTGCTGGCGACCTGCTG TGGGAAACCCAGCGCCCGACCTTTCGCCCGACCACCGTGCAGA GCACCACCGTGTGGCCGCGCACCAGCGAACTGCCGAGCCCGCC GACCCTGGTGACCCCGGAAGGCCCGCGTGTGCGGTGCTGCTGG GCCTGGGCTGGGCTGCTGGCGCCGCTGACCCTGCTGCTGGCG CTGTATCTGCTGCGCAAAGCGTGGCGCCTGCCGAACACCCCGAA ACCGTGTGTTGGGCAACAGCTTTCGCACCCCGATTCAGGAAGAA CATAACCGATGCGCATTTTACCCTGGCGAAAATT	70
Мышиный ОХ40	MYVWVQQPTALLLLALTLGVTARRLNCVKHTYPSGHKCCRECP GHGMVSRCDHTRDTLCHPCETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSG SELKQNCPTPTQDTCRCRPGTQPRQDSGYKLGVDCVPCPPGHFSP GNNQACKPWTNCTLSGKQTRHPASDSLDAVCEDRSLLATLLWET QRPTFRPTTVQSTTVWPRTSELPSPPTLVTEGPAFAVLLGLGLGLL APLTVLLALYLLRKAWRLPNTPKPCWGNFRTPIQEEHTDAHFTLA KI	71
ICOS человека	ATGAAAAGCGGCCTGTGGTATTTTTTCTGTTTTGCCTGCGCATT AAAGTGCTGACCGGCGAAATTAACGGCAGCGCGAACTATGAAA TGTTTTATTTTTCATAACGGCGGCGTGAGATTCTGTGCAAATAT CCGGATATTGTGCGAGTTTAAAATGCAGCTGCTGAAAGGCG GCCAGATTCTGTGCGATCTGACCAAAAACCAAAGGCAGCGGCAA CACCGTGAGCATTAAGCCTGAAATTTTGCATAGCCAGCTGA GCAACAACAGCGTGAGCTTTTTTCTGTATAACCTGGATCATAGC CATGCGAACTATTATTTTTGCAACCTGAGCATTTTTGATCCGCCG CCGTTTAAAGTGACCTGACCGGCGGCTATCTGCATATTTATGA AAGCCAGCTGTGCTGCCAGCTGAAATTTTGGCTGCCGATTGGCT GCGCGCGTTTTGTGGTGGTGTGCATTCTGGGCTGCATTGTGATT TGCTGGCTGACCAAAAAAAAAATATAGCAGCAGCGTGCATGATC CGAACGGCGAATATATGTTTATGCGCGCGGTGAACACCGCGAA AAAAAGCCGCTGACCGATGTGACCCTG	72
ICOS человека	MKSLGWYFFLFLCLRIK VLTGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPD IVQQFKMQLLKGQILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSV SFFLYNLDHSHANYFYCNLSIFDPPPFK VTLTGGYLHIYESQLCCQL KFWLPIGCAAFVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMR AVNTAKKSRLTDVTL	73
Мышиный ICOS	ATGAAACCGTATTTTTGCGCGTGTGTTGTTTGGCTTTCTGATT CGCCTGCTGACCGGCGAAATTAACGGCAGCGCGGATCATCGCA TGTTTAGCTTTCATAACGGCGGCGTGAGATTAGCTGCAAATAT CCGGAACCGTGAGCAGCTGAAAATGCGCCTGTTTCGCGAAC GCGAAGTGTGCGAACTGACCAAAAACCAAAGGCAGCGGCAA CGCGGTGAGCATTAACCCGATGCTGTGCCTGTATCATCTGA GCAACAACAGCGTGAGCTTTTTTCTGAACAACCCGGATAGCAGC CAGGGCAGCTATTATTTTGCAGCCTGAGCATTTTTGATCCGCC GCCGTTTTCAGGAACGCAACCTGAGCGGCGGCTATCTGCATATTT ATGAAAGCCAGCTGTGCTGCCAGCTGAACTGTGGCTGCCGGTG GGCTGCGCGGCGTTTTGTGGTGGTGTGCTGCTGTTTGGCTGCATTCT GATTATTTGGTTTAGCAAAAAAAAAATATGGCAGCAGCGTGCATG	74

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQID NO
	ATCCGAACAGCGAATATATGTTTATGGCGGCGGTGAACACCAA CAAAAAAAGCCGCCTGGCGGGCGTGACCAGC	
Мышиный ICOS	MKPYFCRVFVFCFLIRLLTGEINGSADHRMFSFHNGGVQISCKYPE TVQQLKMRLFREREVLCELTCKTKGSGNAVSIKNPMLCLYHLSNNS VSFFLNNPDSSQGSYYFCSLSIFDPPPFQERNLSGGYLHIYESQLCC QLKLWLPVGCFAFVVVLLFGCILIIWFSSKKKYGSSVHDPNSEYMF MAAVNTNKKSRLAGVTS	75
DAP10 человека	ATGATTCATCTGGGCCATATTCTGTTTCTGCTGCTGCTGCCGGTG GCGGCGGCGCAGACCACCCGGGCGAACGCAGCAGCCTGCCGG CGTTTTATCCGGGCACCAGCGGCAGCTGCAGCGGCTGCCGCAGC CTGAGCCTGCCGCTGCTGGCGGGCCTGGTGGCGGCGGATGCCGT GGCGAGCCTGCTGATTGTGGGCGCGGTGTTTCTGTGCGCGCGCC CGCGCCGAGCCCGGCGCAGGAAGATGGCAAAGTGTATATTA CATGCCGGGCCGCGGC	76
DAP10 человека	MIHLGHILFLLLLPVAQAQTTPGERSSLPAYPGTSGSCSGCGLSL PLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGR G	77
Мышиный DAP10	ATGGATCCGCGGGCTATCTGCTGTTTCTGCTGCTGCTGCCGGT GGCGGCGAGCCAGACCAGCGCGGGCAGCTGCAGCGGCTGCCGC ACCCTGAGCCTGCCGCTGCTGGCGGGCCTGGTGGCGGCGGATGC GGTGATGAGCCTGCTGATTGTGGGCGTGGTGTGTTGTGTGCATGC GCCCGCATGGCCGCCCGGCGCAGGAAGATGGCCGCGTGTATAT TAACATGCCGGGCCGCGGC	78
Мышиный DAP10	MDPPGYLLFLLLLPVAASQTSAGSCSGCGLSLPLLAVADAV MSLLIVGVFVCMRPHGRPAQEDGRVYINMPGRG	79
DAP12 человека	ATGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCT CCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGCCAGGCC AGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGTGTGGCA GGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGTGACAGTGCTCATTGCCCT GGCCGTGTACTTCTGGGCCGGTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGG CTGCGGAGGCAGCGACCCGAAACAGCGTATCACTGAGACCGA GTGCGCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACA GCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAATGA	80
DAP12 человека	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGI VMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPY QELQGQRSDVYSDLNTRPYK	81
Мышиный DAP12	ATGGGGGCTCTGGAGCCCTCCTGGTGCCTTCTGTTCCCTCCTGTC CTCCTGACTGTGGGAGGATTAAGTCCCGTACAGGCCAGAGTGA CACTTCCCAAGATGCGACTGTTCTTCCGTGAGCCCTGGTGTAC TGGCTGGGATTGTTCTGGGTGACTTGGTGTGACTCTGCTGATT GCCCTGGCTGTGACTCTCTGGGCCCTGGTCTCCCAGAGTCA AGGACAGCGGAAGGGACCCGAAACAACACATTGCTGAGACT GAGTCGCCTTATCAGGAGCTTCAGGGTCAGAGACCAGAAGTAT ACAGTGACCTCAACACACAGAGGCAATATTACAGATGA	82
Мышиный DAP12	MGALEPSWCLLFLPVLLTVGGLSPVQAQSDTFPRCDCSSVSPGVLA GIVLGDVLTLLIALAVYSLGRLVSRGQGTAEGRKQHIAETESPY QELQGQRPEVYSDLNTRQYYR	83
CD3z человека	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILT ALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRG RDPENMGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	84
CD3z человека	ATGAAGTGGAAGGCGTTTTACCCGCGGCATCCTGCAGGCACA GTTGCCGATTACAGAGGCACAGAGCTTTGGCCTGCTGGATCCCA AACTCTGCTACCTGCTGGATGGAATCCTCTTCATCTATGGTGT ATTCTCACTGCCTTGTCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGC AGAGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACA AGAGACGTGGCCGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAA	85

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQID NO
	GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA	
Мышиный CD3z	MKWKVSVLACILHVRFPGAEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVIIITALYLRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPPEMGGKQRRRNPNQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR	86
Мышиный CD3z	ATGAAGTGGAAAGTGTCTGTTCTCGCCTGCATCCTCCACGTGCGTTCACAGGAGCAGAGGCACAGAGCTTTGGTCTGCTGGATCCCAAACTCTGCTACTTGTCTAGATGGAATCCTCTTCATCTACGGAGTCTATCATCACAGCCCTGTACCTGAGAGCAAAATTCAGCAGGAGTGCAGACTGCTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTTACAATGAGCTCAATCTAGGGCGAAGAGAGGAATATGACGTCTTGGAGAGAAGCGGGCTCGGGATCCAGAGATGGGAGGCAAACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCAAGGAGGCGTATACAATGCACTGCAGAAAGACAAGATGGCAGAAGCCTACAGTGAGATCGGCACAAAAGGCGAGAGGGCGGAGAGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGCAGACCTGGCCCCCTCGCTAA	87
FCGR3A человека	MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDKHFKWRKDPQDK	88
FCGR3A человека	ATGTGGCAGCTGCTGCTGCCGACCGCGCTGCTGCTGCTGGTGAGCGCGGGCATGCGCACCGAAGATCTGCCGAAAGCGGTGGTGTTCCTGGAACCGCAGTGGTATCGCGTGCTGGAAAAAGATAGCGTGACCCTGAAATGCCAGGGCGCGTATAGCCCGGAAGATAACAGCACCCAGTGGTTTCATAACGAAAGCCTGATTAGCAGCCAGGCGAGCAGCTATTTTATTGATGCGGCGACCGTGGATGATAGCGGCGAATATCGCTGCCAGACCAACCTGAGCACCTGAGCGATCCGGTGCAGCTGGAAGTGCATATTGGCTGGCTGCTGCTGCAGGCGCCGCGCTGGGTGTTTAAAGAAGAAGATCCGATTCATCTGCGCTGCCATAGCTGAAAAACACCGCGCTGCATAAAGTGACCTATCTGCAGAACCGGCAAGGCGCAAATATTTTCATCATAACAGCGATTTTTATATTCCGAAAGCGACCCCTGAAAGATAGCGGCAGCTATTTTTGCCGCGGCTGTTTGGCAGCAAAAACGTGAGCAGCGAAACCGTGAACATTAACATTACCCAGGGCCTGGCGGTGAGCACCATTAGCAGCTTTTTCCGCCGGGCTATCAGGTGAGCTTTTGCCTGGTGATGGTGCTGCTGTTTGGGTGGATACCGGCCTGTATTTTAGCGTGAAAACCAACATTCGCAGCAGCACCCGCGATTGGAAAGATCATAAATTTAAATGGCGCAAAGATCCGCAGGATAAA	89
Мышиный FCGR3A	MFQNAHSGSQWLLPPLTILLFAFADRQSAALPKAVVKLDPPWIQVLKEDMVTLMCEGTHNPNSSTQWFHNGRSIRSQVQASYTFKATVNDSGEYRCQMEQTRLSDPVDLGVISDWLLQTPQRFLEGETITLRCHSWRNKLLNRISFFHNEKSVRYHHYKSNFSIPKANHSHSGDYCYCKGSLGSTQHQSHPVTITVQDPATSSISLVWYHTAFSLVMCLLFAVDTGLYFYVRRNLQTPREYWRKSLSIRKHQAPQDK	90
Мышиный FCGR3A	ATGTTTCAGAATGCACACTCTGGAAGCCAATGGCTACTTCCACCCTGACAATTCTGCTGCTGTTTGGCTTTTGCAGACAGGCAGAGTGCAGCTCTTCCGAAGGCTGTGGTGAAACTGGACCCCATGGATCAGGTGCTCAAGGAAGACATGGTGACACTGATGTGCGAAGGGAACCCACAACCCTGGGAACTCTTCTACCCAGTGGTTCCACAACGGGAGGTCCATCCGGAGCCAGGTCCAAGCCAGTTACACGTTTAAAGGCACAGTCAATGACAGTGGAGAATATCGGTGTCAAATGGAGCAG	91

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQID NO
	ACCCGCCTCAGCGACCCTGTAGATCTGGGAGTGATTTCTGACTG GCTGCTGCTCCAGACCCCTCAGCGGGTGTCTGGAAGGGGAAA CCATCACGCTAAGGTGCCATAGCTGGAGGAACAACTACTGAA CAGGATCTCATTCTTCCATAATGAAAAATCCGTGAGGTATCATC ACTACAAAAGTAATTTCTCTATCCCAAAAAGCCAACCACAGTCAC AGTGGGGACTACTACTGCAAAGGAAGTCTAGGAAGTACACAGC ACCAGTCCAAGCCTGTCACCATCACTGTCCAAGATCCAGCAACT ACATCCTCCATCTCTCTAGTCTGGTACCACACTGCTTTCTCCCTA GTGATGTGCCTCCTGTTTGCAGTGGACACGGGCCTTTATTTCTAC GTACGGAGAAAATCTTCAAACCCCGAGGGAGTACTGGAGGAAGT CCCTGTCAATCAGAAAGCACCCAGGCTCCTCAAGACAAGTGA	
НКГ2D человека	MGWIRGRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKS KRENASPFFFCCFIAVAMGIRFIIMVAIWSAVFLNSLNFNQEVQIPLT ESYCGPCPNWICYKNNCYQFFDESKNYESQASCMSQNASLLK VYSKEDQDLLKLKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTI IEMQKGDICALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV	92
НКГ2D человека	ATGGGCTGGATTGCGGGCCGCGCAGCCGCATAGCTGGGAAA TGAGCGAATTTATAACTATAACCTGGATCTGAAAAAAGCGAT TTTAGCACCCGCTGGCAGAAACAGCGCTGCCCGGTGGTGAAAA GCAAATGCCGCGAAAACGCGAGCCCGTTTTTTTTTTGCTGCTTT ATTGCGGTGGCGATGGGCATTCGCTTTATTATTATGGTGGCGAT TTGGAGCGCGGTGTTTCTGAACAGCCTGTTTAACCAGGAAGTGC AGATTCCGCTGACCGAAAAGCTATTGCGGCCCGTGCCCGAAAAA CTGGATTTGCTATAAAAAACAACCTGCTATCAGTTTTTTGATGAAA GCAAAAACCTGGTATGAAAGCCAGGCGAGCTGCATGAGCCAGAA CGCGAGCCTGCTGAAAGTGTATAGCAAAGAAGATCAGGATCTG CTGAAAACCTGGTAAAAAGCTATCATTGGATGGGCCTGGTGCATAT TCCGACCAACGGCAGCTGGCAGTGGGAAGATGGCAGCATTCTG AGCCCGAACCTGCTGACCATTATTGAAATGCAGAAAGGCGATT GCGCGCTGTATGCGAGCAGCTTAAAGGCTATATTGAAAACCTGC AGCACCCCGAACACCTATATTTGCATGCAGCGCACCCGTG	93
Мышиный НКГ2D	MALIRDRKSHHSEMSKCHNYDLKPAKWDTSQEQKQRLALTTSQ PGENGIIRGRYPKELKISPMFVVRVLAIALAIRFTLNTLMWLAIKFE TFQPVLCNKEVPVSSREGYCGPCPNWICHRNNCYQFFNEEKTNW QSQASCLSQNSSLLKIYSKEEQDFLKLKSYHWMGLVQIPANGSW QWEDGSSLSYNQLTLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDCANLNTYIC MKRAV	94
Мышиный НКГ2D	ATGGCGCTGATTGCGGATCGCAAAAGCCATCATAGCGAAATGA GCAAATGCCATAACTATGATCTGAAACCGGCGAAATGGGATAC CAGCCAGGAACAGCAGAAACAGCGCCTGGCGCTGACCACCAGC CAGCCGGGCGAAAACGGCATTATTCGCGGCCGCTATCCGATTGA AAAACCTGAAAATTAGCCCGATGTTTGTGGTGCAGCTGCTGGCGA TTGCGCTGGCGATTGCTTTACCCTGAACACCCTGATGTGGCTG GCGATTTTTAAAGAAACCTTTACGCCGGTGTGTGCAACAAAGA AGTGCCGGTGAGCAGCCGCGAAGGCTATTGCGGCCCGTGCCCG AACAACTGGATTTGCCATCGCAACAACCTGCTATCAGTTTTTTAA CGAAGAAAAAACCTGGAACCAGAGCCAGGCGAGCTGCCTGAGC CAGAACAGCAGCCTGCTGAAAATTTATAGCAAAGAAGAACAGG ATTTTCTGAAAACCTGGTAAAAAGCTATCATTGGATGGGCCTGGTG CAGATTCGCGCGAACGGCAGCTGGCAGTGGGAAGATGGCAGCA GCCTGAGCTATAACCAGCTGACCCTGGTGGAAATTCGAAAGG CAGCTGCGCGGTGTATGGCAGCAGCTTAAAGCGTATACCGAA GATTGCGCGAACCTGAACACCTATATTTGCATGAAACGCGCGGT G	95
CD28 YMNM	YMNM	96
CD28 PYAP	PYAP	97
CD28	FMNM	98

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQID NO
FMNM		
CD28 AYAA	AYAA	99
Сигнальный пептид	ATMGWSCILFLVATATGVHS	100
Последовательность ДНК сигнального пептида	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGTGTGCACTCC	101
Тяжелая цепь анти-CD20 (GA101)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQG LEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	102
Легкая цепь анти-CD20 (GA101)	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSHNGITLYYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDGVVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	103
Тяжелая цепь PGLALA анти-FAP(4B9)	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWSVAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	104
Легкая цепь анти-FAP(4B9)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	105
Тяжелая цепь PGLALA анти-CEA (A5B7)	EVQLVESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGL LEWVGFIRNKANGGTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDRLRFYFDYWGQGT T VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	106
Легкая цепь анти-CEA (A5B7)	QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVGAYS IYWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVSSRF SASKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHS GASAVFGGGTKLTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	107
Тяжелая цепь PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQG LEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMA YWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLA	108

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQID NO
анти-СЕА (Т84.66LCH А)	PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVL QSSGL YSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	
Легкая цепь анти-СЕА (Т84.66LCH А)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQ APRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QTNEDPYTFGGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	109
Тяжелая цепь PGLALA анти-СЕА (CH1A1A98/ 992F1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQG LEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGT TTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVL QSSGL YSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	110
Легкая цепь анти-СЕА (CH1A1A98/ 992F1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGT YVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYY TYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	111
Тяжелая цепь PGLALA анти-СЕА (hMN14)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGDFTTYWMSWVRQAPGKG LEWIGEIHPSSTINYAPSLKDRFTISRDNKNTLFLQMDSL RPEDT GVYFCASLYFGFPWFAYWGQGTPTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDFFLYS KLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	112
Легкая цепь анти-СЕА (hMN14)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPK LLIYWTSTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTTIISSLQPEDIATYYCQQYS LYRSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	113
Тяжелая цепь PGLALA анти-TNC (2B10)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARLYGYAYYGAFDYWGQGT TTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDF FLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	114
Легкая цепь анти-TNC (2B10)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPK RLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQNG LQPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL SKA	115

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQID NO
	DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
Fc IgG1 человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	116
CD8 человека	MRNQAPGRPKGATFPPRRPTGSRAPPLAPELRAKQRPGERVMALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKQCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKS GDKPSLSARYV	117
CD8 человека	ATGCGCAACCAGGCGCCGGCCGCCCGAAAGCGCGACCTTTCGCGCGCCGCGCCGACCGGCAGCCGCGCGCCGCGCTGGCGCCGGAACCTGCGCGCGAAACAGCGCCCGGGCGAACGCGTGATGGCGCTGCCGGTGACCGCGCTGCTGCTGCCGCTGGCGCTGCTGCTGCA TGCGGCGCGCCGAGCCAGTTTCGCGTGAGCCCGCTGGATCGCACCTGGAACCTGGGCGAAACCGTGGAACCTGAAATGCCAGGTGCTGCTGAGCAACCCGACCAGCGGCTGCAGCTGGCTGTTTCAGCCGCGCGGCGCGGCGGCGAGCCCGACCTTCTGCTGTATCTGAGCCAGAACAAACCGAAAGCGGCGGAAGGCCTGGATACCCAGCGCTTTAGCGGCAAACGCCTGGGCGATACCTTGTGCTGACCCTGAGCGATTTTCGCCGCGAAAACGAAGGCTATTATTTTTGCAGCGCGCTGAGCAACAGCATTATGTATTTTAGCCATTTTGTGCCGGTGTTTCTGCCGGCGAAACCGACCACCACCCCGGCGCCGCGCCGCGGACCCCGGCGCCGACCATTTGCGAGCCAGCCGCTGAGCCTGCGCCCGGAAGCGTGCCGCCC GGCGGCGGGCGGCGGCGGCGGTGCATACCCGCGGCTGGATTTTGC GTGCGATATTTATATTTGGGCGCCGCTGGCGGGCACTGCGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTGATTACCCTGTATTGCAACCATCGCAACCCGCGCCGCGTGTGCAAATGCCCGCGCCCGGTGGTGA AAAAGCGGCGATAAACCGAGCCTGAGCGCGCGCTATGTG	118
Мышиный CD8	MASPLTRFLSLNLLMGESIILGSGEAKPQAPELRIFPKKMDAELGQKVDLVCEVLGSVSVQGSWLFQNSSSKLPQPTFVYVYMASSHNKITWDEKLNSSKLFSAVRDTNNKYVLTLNKF SKENEGYYFCSVISNSVMYFSSVVPVLQKVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSKVKG TGLDFACDIYIWAPLAGICVAPLLSLIITLIC YHRSRKR VCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV	119
Мышиный CD8	ATGGCGAGCCCGCTGACCCGCTTCTGAGCCTGAACCTGCTGCTGATGGGCGAAAGCATTATTCTGGGCAGCGGCGAAGCGAAACCGCAGGCGCCGGAACCTGCGCATTTTTCCGAAAAAAATGGATGCGGAACTGGGCCAGAAAGTGATCTGGTGTGCGAAGTGCTGGGCAGCGTGAGCCAGGGCTGCAGCTGGCTGTTTCAGAACAGCAGCAGCAAACCTGCCGAGCCGACCTTGTGGTGTATATGGCGAGCAGCCATAACAAAATTACCTGGGATGAAAACTGAACAGCAGCAAACCTGTTAGCGCGGTGCGCGATACCAACAACAAATATGTGCTGACCCTGAACAAATTTAGCAAAGAAAACGAAGGCTATTATTTTTGCAGCGTGATTAGCAACAGCGTGATGATTTTAGCAGCGTGGTGCCGGTGCTGCAGAAAGTGAACAGCACCACCACCAACCGGTGCTGCGCACCCCGAGCCCGGTGCATCCGACCCGACCCAGCCAGCCGCGAGCGCCGGAAGATTGCCGCCCGCGCGGCGAGCGTGAAAGGCACCCGCTGGATTTTGC GTGCGATATTTATATTTGGGCGCCGCTGGCGGGCATTTGCGTGCGGCGCCGCTGCTGAGCCTGATTATTACCCTGATTGCTATCATCGCAGCCGCAAACGCGTGTGCAAATGCCCGCGCCCGCTGGTGCGCCAGGAAGGCAAACCGCGCCCGAGCGAAAAAATT	120

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
	GTG	

Таблица 9. Типовые аминокислотные последовательности VH1VL1 P329G-CAR:

Определение CDR в соответствии с Кабатом

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
VH1 CDR H1	смотрите Таблицу 2	1
VH1 CDR H2	смотрите Таблицу 6	40
VH1 CDR H3	смотрите Таблицу 2	3
VL1 CDR L1	смотрите Таблицу 2	4
VL1 CDR L2	смотрите Таблицу 2	5
VL1 CDR L3	смотрите Таблицу 2	6
Слияние VH1 VL1- CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRYWMNWVRQAPG KGLEWVGEITPDSSTINYTPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCVRPYDYGAWFASWGQGTLLTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGSLKP TTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	121
VH1 VH	смотрите Таблицу 6	41
VL1 VL	смотрите Таблицу 2	9
scFv VH1 VL1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRYWMNWVRQAPG KGLEWVGEITPDSSTINYTPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCVRPYDYGAWFASWGQGTLLTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	122
CD8ATD	смотрите Таблицу 2	11
CD137CSD	смотрите Таблицу 2	12
CD3zSSD	смотрите Таблицу 2	13
CD28ATD- CD137CSD- CD3zSSD	смотрите Таблицу 2	14
eGFP	смотрите Таблицу 2	15
линкер (G4S) ⁴	смотрите Таблицу 2	16
линкер G4S	смотрите Таблицу 2	17
линкер T2A	смотрите Таблицу 2	18
CD8stalk	смотрите Таблицу 2	19

Таблица 10. Типовые аминокислотные последовательности VH2VL1

P329G-CAR:

Определение CDR в соответствии с Кабатом

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
VH2 CDR H1	смотрите Таблицу 2	1
VH2 CDR H2	смотрите Таблицу 2	2
VH2 CDR H3	смотрите Таблицу 2	3
VL1 CDR L1	смотрите Таблицу 2	4
VL1 CDR L2	смотрите Таблицу 2	5
VL1 CDR L3	смотрите Таблицу 2	6
Слияние VH2VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDVSRVYWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRPYDYGAWFASWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWFVGGGTKLTVLGGGGSLKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	123
VH2 VH	смотрите Таблицу 6	44
VL1 VL	смотрите Таблицу 2	9
scFv VH2VL1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDVSRVYWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRPYDYGAWFASWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWFVGGGTKLTVL	124
CD8ATD	смотрите Таблицу 2	11
CD137CSD	смотрите Таблицу 2	12
CD3zSSD	смотрите Таблицу 2	13
CD28ATD-CD137CSD-CD3zSSD	смотрите Таблицу 2	14
eGFP	смотрите Таблицу 2	15
линкер (G4S) ₄	смотрите Таблицу 2	16
линкер G4S	смотрите Таблицу 2	17
линкер T2A	смотрите Таблицу 2	18
CD8stalk	смотрите Таблицу 2	19

5 Таблица 11. Типовые аминокислотные последовательности VH3VL1

P329G-CAR, стабилизированные дисульфидом:

Определение CDR в соответствии с Кабатом

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
VH3 CDR H1	смотрите Таблицу 2	1
VH3 CDR H2	смотрите Таблицу 2	2
VH3 CDR H3	смотрите Таблицу 2	3
VL1 CDR L1	смотрите Таблицу 2	4
VL1 CDR L2	смотрите Таблицу 2	5
VL1 CDR L3	смотрите Таблицу 2	6

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Слияние VH3VL1(ds)- CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPG KCLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVLGGGGSLKP TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNLNEL NLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	125
VH3 (ds) VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPG KCLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSS	126
VL1 (ds) VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPD HLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAE YYCALWYSNHWVFGCGTKLTVL	127
VH3VL1 (ds) scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPG KCLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVL	128
CD8ATD	смотрите Таблицу 2	11
CD137CSD	смотрите Таблицу 2	12
CD3zSSD	смотрите Таблицу 2	13
CD28ATD- CD137CSD- CD3zSSD	смотрите Таблицу 2	14
eGFP	смотрите Таблицу 2	15
линкер (G4S) ⁴	смотрите Таблицу 2	16
линкер G4S	смотрите Таблицу 2	17
линкер T2A	смотрите Таблицу 2	18
CD 8stalk	смотрите Таблицу 2	19

Таблица 12. Дополнительные типовые аминокислотные последовательности VH3VL1 P329G-CAR (HuR968B):

Определение CDR в соответствии с Кабатом

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
VH3 CDR H1	RYWMN	1
VH3 CDR H2	EITPDSSTINYAPSLKG	2
VH3 CDR H3	PYDYGAWFAS	3
VL1 CDR L1	RSSTGAVTTSNYAN	4
VL1 CDR L2	GTNKRAP	5
VL1 CDR L3	ALWYSNHWV	6
Слияние VH3VL1- CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD (HuR968B)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPG KGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGSIYI	129

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
	WAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	
ДНК HuR968B	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTACTACTGCCCTGGCCCTT CTGCTTCATGCTGCTAGACCTGAGGTGCAGCTGGTGGAATCT GGGGGGGGCTTGGTTCAGCCTGGGGGCAGCCTGAGACTGAG CTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTCAGCAGATATTGGATGAA CTGGGTGAGACAAGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGG GGGAGATCACCCCTGACAGCAGCACCATCAACTATGCCCTA CCTGAAGGGCAGATTACCATCAGCAGAGACAATGCCAAG AACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGA CACAGCTGTGACTATTGTGCTAGACCCTATGACTATGGGGC CTGGTTTGCTAGCTGGGGCCAAGGCACCCTAGTAACAGTGTC ATCTGGGGGGGGAGGATCTGGGGGGGGGGTTCTGGGGGGG GGGGCTCTGGTGGGGGGGGTTCTCAAGCTGTGGTAAACAAA GAGCCTAGCCTGACAGTGAGCCCTGGGGGCACAGTGACCCT GACCTGCAGAAGCAGCACTGGGGCTGTGACCACAAGCAACT ATGCCAACTGGGTGCAAGAGAAGCCTGACCACCTGTTCACTG GCCTGATTGGGGGCACCAATAAGAGAGCACCTGGCACTCCT GCTAGATTTTCTGGCTCACTGCTGGGGGGCAAGGCTGCCTTG ACCCTTTCTGGGGCTCAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTACTAC TGTGCTCTCTGGTACAGCAACCCTGGGTGTTTGGGGGGGGC ACCAAGCTGACAGTGCTGGGGGGGGGGGTAGCATCTACAT CTGGGCCCCCTGGCTGGCACATGTGGGGTGTGCTGCTGAG CCTGGTGATCACCTGTACTGCAAGAGAGGCAGAAAAGAAGC TGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAGACCTGTGCAGA CCACCCAAGAGGAGGATGGCTGCAGCTGCAGATTCCCTGAG GAGGAGGAGGGGGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAG ATCTGCTGATGCCCTGCCTATCAGCAAGGGCAGAATCAGCT GTATAATGAGCTCAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTATGATG TGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGACCCTGAGATGGGGGGC AAGCCTAGAAGAAAGAACCCCAAGAGGGCCTGTACAATGA GCTGCAAAAGGACAAGATGGCTGAGGCCTACTCTGAGATTG GCATGAAGGGGGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCATGATGG CCTGTACCAAGGCCTGAGCACAGCCACCAAGGACACTTATG ATGCCTTGACATGCAAGCCCTGCCTCCAAGATGA	130
VH3 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPG KGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLLVTVSS	8
VL1 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPD HLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAE YYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	9
scFv VH3VL1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPG KGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSAVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	10
CD8ATD'	IYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYC	131
CD137CSD	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	12
CD3zSSD	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	13
линкер (G4S)4	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	16
линкер G4S	GGGGS	17
линкер T2A	GEGRGSLLTCGDVEENPGP	18

Таблица 13. Дополнительные типовые аминокислотныепоследовательности VH3VL1 P329G-CAR (HuR9684M):

Определение CDR в соответствии с Кабатом

Конструкт	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
VH3 CDR H1	RYWMN	1
VH3 CDR H2	EITPDSSTINYAPSLKG	2
VH3 CDR H3	PYDYGAWFAS	3
VL1 CDR L1	RSSTGAVTTSNYAN	4
VL1 CDR L2	GTNKRAP	5
VL1 CDR L3	ALWYSNHWW	6
Слияние VH3VL1- CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD (HuR9684M)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPG KGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLGAQPEDEAEYCALWYSNHWWVFGGGTKLTVLESKYGPPC PPCFWVLLVVVGGVLACYSLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQ QGQNLQYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQUALPPR	132
ДНК HuR968B	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTATTAAGTCCCTGGCCCTT CTGTTACATGCTGCTAGACCTGAGGTTCAACTGGTGGAGTCT GGGGGGGGCCTAGTGCAGCCTGGGGGCAGCCTGAGACTGAG CTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTCAGCAGATACTGGATGAA CTGGGTGAGACAAGCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGG GGGAGATCACCCCTGACAGCAGCACCATCAACTATGCCCTA GCCTGAAGGGCAGATTACCATCAGCAGAGACAATGCCAAG AACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGA CACAGCTGTGATTATTGTGCTAGACCATATGACTATGGGGC CTGGTTTGCCTCTTGGGGCCAAGGCACACTGGTTACAGTGAG TTCTGGGGGGGGGGTCTGGAGGGGGGGGATCTGGGGGTG GAGGTTCTGGGGGGGGGGCAGTCAAGCTGTGGTGACCCAA GAGCCTAGCCTGACAGTGTCCCCTGGGGGCACAGTACCCTG ACCTGCAGAAGCAGCACTGGGGCTGTGACCACAAGCAACTA TGCCAACCTGGGTGCAAGAGAAGCCTGACCACCTGTTCACTGG CCTGATTGGGGGCACCAACAAAAGAGCCCCTGGCACCCCTG CTAGATTCTCTGGAAGCCTGTTGGGGGGCAAGGCTGCCCTGA CCCTATCTGGGGCAGCAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTACTACT GTGCCCTCTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTTGGGGGGGGCA CCAACTGACAGTGTGGAGAGCAAGTATGGCCCCCCTGTC CTCCCTGTCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTTGTGGGGGGGGTGC TGGCCTGTACAGCCTGCTGGTGACAGTGGCCTTCATCATCT TCTGGGTGAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACTCTGAC TACATGAACATGACCCCTAGAAGACCTGGCCCCACAAGAAA GCACTATCAGCCCTATGCCCCCCTAGAGACTTTGCTGCCTA CAGAAGCAGAGTGAAGTTCAGCAGATCTGCTGATGCCCTGC CTATCAGCAAGGGCAGAATCAGCTGTATAATGAGCTCAACCT GGGCAGAAGAGAGGAGTATGATGTGCTGGACAAGAGAAGAG GCAGAGACCCTGAGATGGGGGGCAAGCCTAGAAGAAAGAAC CCCCAAGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAAAAGGACAAGAT GGCTGAGGCCTACTCTGAGATTGGCATGAAGGGGGGAGAGAA GAAGAGGCAAGGGCCATGATGGCCTGTACCAAGGCCTGAGC ACAGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTACATATGCAAGCT CTGCCCCCTAGATGA	133

VH3 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPG KGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSS	8
VL1 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPD HLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAE YYCALWYSNHWFVGGGTKLTVL	9
scFv VH3VL1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQAPG KGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWFVGGGTKLTVL	10
CD28ATD	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	134
CD137CSD	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	12
CD3zSSD	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	13
линкер (G4S)4	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	16
линкер IgG4m	ESKYGPPCPPCP	135
линкер T2A	GEGRGSLLTCDGVEENPGP	18

Таблица 14. Дополнительные типовые домены VH/VL антител:

A6 VH	EVQLLDSSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYVMSWVRQAPGKGL NWXVSTISHSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAIDAPYYDILTGYRYWGQGTLVTVSS	136
A6 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPKGAPKL LIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNS YSYTFGGGTKLEIK	137
Zmab VH	QVQLQPPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGQG LEWIGNIYPSDSTNYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSED SAVYYCTRSWRGNSFDYWGQGTTTLTVSS	138
Zmab VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQK PGQPKLLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVY YCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK	139

Примеры

- 5 Ниже приведены примеры способов и композиций по настоящему изобретению. Следует понимать, что на практике можно реализовать ряд других вариантов осуществления с учетом общего описания, приведенного выше.

Методики рекомбинантных ДНК

- 10 Для манипуляций с ДНК применяли стандартные способы, описанные в Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Молекулярные биологические реагенты использовали в соответствии с инструкциями производителя. Общая информация в отношении нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческих иммуноглобулинов
15 приведена в: Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242.

Секвенирование ДНК

Последовательности ДНК определяли с помощью секвенирования двух цепей.

Синтез генов

5 Требуемые генные сегменты, при необходимости, получали с помощью ПЦР с применением соответствующих матриц или синтезировали Geneart AG (Регенсбург, Германия) из синтетических олигонуклеотидов и продуктов ПЦР с помощью автоматизированного синтеза генов. В случаях, когда точная генная последовательность была недоступна, олигонуклеотидные праймеры
10 конструировали на основании последовательностей самых близких гомологов и выделяли гены с помощью ОТ-ПЦР из РНК из соответствующей ткани. Генные сегменты, фланкируемые сингулярными сайтами расщепления рестрикционной эндонуклеазой, клонировали в стандартные векторы для клонирования/секвенирования. Плазмидную ДНК очищали из
15 трансформированных бактерий, а концентрацию определяли с помощью УФ-спектрокопии. Последовательность ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали с помощью секвенирования ДНК. Генные сегменты конструировали с подходящими рестрикционными сайтами, чтобы обеспечить возможность субклонирования в соответствующие экспрессионные векторы. Все
20 конструкции конструировали с 5'-концевой последовательностью ДНК, кодирующей лидерный пептид, который направляет белки для секреции в эукариотических клетках.

Получение IgG-подобных белков в клетках HEK293 EBNA или CHO EBNA

25 Антитела и биспецифические антитела создавали с помощью временной трансфекции клеток HEK293 EBNA или клеток CHO EBNA. Клетки центрифугировали и заменяли среду предварительно нагретой средой CD CHO (Thermo Fisher, кат. № 10743029). Экспрессионные векторы смешивали в среде CD CHO, добавляли PEI (полиэтиленимин, Polysciences, Inc, кат. № 23966-1),
30 перемешивали раствор на вортексе и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. После этого клетки (2 млн/мл) смешивали с раствором вектор/PEI, переносили в колбу и инкубировали в течение 3 часов при 37°C во встряхиваемом инкубаторе с атмосферой 5% CO₂. После инкубации добавляли среду Excell с добавками (80% от общего объема) (W. Zhou and A. Kantardjiev,

Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing, DOI: 10.1007/978-3-642-54050-9; 2014). Через один день после трансфекции добавляли добавки (Feed, 12% от общего объема). Клеточные супернатанты собирали через 7 дней путем центрифугирования и последующей фильтрации (0,2 мкм фильтр) и очищали белки из собранного супернатанта стандартными способами, как указано ниже.

Получение IgG-подобных белков в клетках CHO K1

В альтернативном варианте описанные в данном документе антитела и биспецифические антитела были изготовлены EviVria с использованием их собственной векторной системы с помощью стандартных (не на основе ПЦР) методик клонирования и использованием адаптированных к суспензии клеток CHO K1 (изначально полученных от ATCC и адаптированных для бессывороточного роста в суспензионной культуре в EviVria). Для получения в EviVria использовали запатентованные среды, не содержащие животные компоненты и сыворотки (eviGrow и eviMake2), а также запатентованный реагент для трансфекции (eviFect). Супернатант собирали путем центрифугирования и последующей фильтрации (0,2 мкм фильтр) и очищали белки из собранного супернатанта стандартными способами.

Очистка IgG-подобных белков

Белки очищали из профильтрованных клеточных культуральных супернатантов согласно стандартным протоколам. Вкратце, содержащие Fc белки очищали из клеточных культуральных супернатантов с помощью аффинной хроматографии с белком А (уравновешивающий буфер: 20 mM цитрата натрия, 20 mM фосфата натрия, pH 7,5; элюирующий буфер: 20 mM цитрат натрия, pH 3,0). Элюирование проводили при pH 3,0 с последующей немедленной нейтрализацией pH образца. Белок концентрировали путем центрифугирования (Millipore Amicon® ULTRA-15 (изд. №: UFC903096) и отделяли агрегированный белок от мономерного белка с помощью эксклюзионной хроматографии в 20 mM гистидине, 140 mM хлориде натрия, при pH 6,0.

Аналитические методы в отношении IgG-подобных белков

Концентрации очищенных белков определяли путем измерения поглощения на 280 нм, используя массовый коэффициент экстинкции, рассчитанный на основании аминокислотной последовательности, в соответствии с Pace, et al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423. Чистоту и

молекулярную массу белков анализировали с помощью КЭ-ДСН в присутствии или отсутствии восстанавливающего средства, используя LabChipGXII или LabChip GX Touch (Perkin Elmer). Определение содержания агрегатов проводили способом HPLC-хроматографии при 25°C, используя аналитическую эксклюзионную колонку (TSKgel G3000 SW XL или UP-SW3000), уравновешенную в подвижном буфере (200 мМ КН₂Р₄, 250 мМ КСl, при рН 6,2, 0,02% NaN₃).

Получение супернатантов лентивируса и трансдукция клеток Jurkat-NFAT

Трансфекцию на основе липофектамина LTX[™] проводили с использованием ~80% конфлюэнтных клеток Hek293T (ATCC CRL3216) и векторов переноса, кодирующих CAR, а также векторов упаковки pCAG-VSVG и psPAX2 в молярном соотношении 2:2:1 (Giry-Laterriere M, et al. al Methods Mol Biol. 2011;737:183-209, Myburgh R, et al Mol Ther Nucleic Acids. 2014). Через 66 ч. супернатант собирали, центрифугировали в течение 5 мин. при 350×g и фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр 0,45 мкм для сбора и очистки вирусных частиц. Вирусные частицы использовали либо непосредственно, либо в концентрированном виде (Lenti-x-Concentrator, Takara) и использовали для спин-инфекции Т-клеток Jurkat NFAT (GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega №CS176501 при 900×g в течение 2 ч. и 31°C).

Анализ активации Jurkat NFAT

Анализ активации Jurkat NFAT измеряет активацию Т-клеток репортерной клеточной линии острого лимфатического лейкоза человека (GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega № CS176501). Эта иммортализованная линия Т-клеток генетически сконструирована так, чтобы стабильно экспрессировать репортер люциферазы, управляемый элементом NFAT-ответа (NFAT-RE). Кроме того, клеточная линия экспрессирует конструкт химерного антигенного рецептора (CAR), содержащую сигнальный домен CD3z. Связывание CAR с иммобилизованной адапторной молекулой (например, адапторной молекулой, связанной с опухолевым антигеном) приводит к поперечному сшиванию CAR, что приводит к активации Т-клеток и экспрессии люциферазы. После добавления субстрата клеточные изменения активности NFAT можно измерить в относительных световых единицах (Darowski et al. Protein Engineering, Design and Selection, Volume 32, Issue 5, May 2019, Pages 207–218,

<https://doi.org/10.1093/protein/gzz027>). Как правило, анализ проводили на планшете 384 (Falcon № 353963, белый, прозрачное дно). Клетки-мишени (клетки CAR-Jurkat-NFAT) и эффекторные клетки высевали в соотношении 1:5 (2000 клеток-мишеней и 10000 эффекторных клеток) по 10 мкл каждые, в RPMI-1640+10% FCS+1% GlutaMax (рост средний) в трех экземплярах. Далее готовили серийные разведения представляющего интерес антитела в питательной среде для получения конечных концентраций в диапазоне от 67 нМ до 0,000067 нМ в планшете для анализа с конечным объемом 30 мкл на лунку в целом. 384-луночный планшет центрифугировали в течение 1 мин. при 300g и КТ и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ во влажной атмосфере. После 7 ч. инкубации добавляли 20% от конечного объема люциферазного анализа ONE-Glo™ (E6120, Promega) и планшеты центрифугировали в течение 1 мин. при 350×g. После этого сразу же измеряли относительные единицы люминесценции (ОЕЛ) на с/лунку с помощью устройства для считывания микропланшетов Tecan. Были подобраны кривые концентрация-ответ, а значения EC₅₀ рассчитывали с использованием GraphPadPrism версии 7. В качестве р-значения использовали общую модель из журнала New England Journal of Medicine, как перечислено в GraphPadPrism 7. Обозначение *= P ≤ 0,033; **= P ≤ 0,002; ***= P ≤ 0,001.

Пример 1

20 **Получение и характеристика гуманизированных антител к P329G**

Исходные и гуманизированные антитела к P329G получали в клетках НЕК и очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А и эксклюзионной хроматографии. Все антитела очищали в высоком качестве (таблица 2).

25 **Таблица 2.** Биохимический анализ антител к P329G. Содержание мономера определяли с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии. Чистоту определяли с помощью невосстанавливающего капиллярного электрофореза с использованием SDS.

Молекула	Мономер [%]	Чистота [%]
huIgG1 к P329G (M-1.7.24)	100	85
huIgG1 к P329G (VH1VL1)	100	97
huIgG1 к P329G (VH2VL1)	100	87
huIgG1 к P329G (VH3VL1)	100	97

Связывание исходного и шести гуманизированных вариантов связующего P329G фрагмента М-1.7.24 с Fc человека (P329G)

	Прибор:	Віасоре T200
	Чип:	CM5 (№ 772)
5	Fc 1-4:	специфический к Fab человека (GE Healthcare 28-9583-25)
	Захват:	50 нМ IgG в течение 60 с
	Аналит:	Fc человека (P329G) (P1AD9000-004)
	Подвижный буфер:	HBS-EP
10	T°:	25°C
	Разведение:	2-кратное разведение в HBS-EP от 0,59 до 37,5 нМ
	Поток:	30 мкл/мин.
	Ассоциация:	240 с
15	Диссоциация:	800 с
	Регенерация:	10 мМ глицина, pH 2,1 в течение 2 x 60 с

Эксперименты ППР проводили на Віасоре T200 с HBS-EP+ в качестве подвижного буфера (0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 0,005% поверхностно-активного вещества P20 (BR-1006-69, GE Healthcare)). Специфические антитела к Fab человека (GE Healthcare, 28-9583-25) непосредственно иммобилизовали посредством аминного сопряжения на чипе CM5 (GE Healthcare). IgG захватывали в течение 60 с при 50 нМ. Двукратное серийное разведение Fc человека (P329G) пропускали над лигандом со скоростью 30 мкл/мин. в течение 240 с для регистрации фазы ассоциации. Фазу диссоциации отслеживали в течение 800 с и инициировали путем переключения с раствора для образца на HBS-EP+. Поверхность чипа восстанавливали после каждого цикла, используя два введения 10 мМ глицина, pH 2,1, в течение 60 с. Разницу объемного показателя преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного на эталонной проточной ячейке 1. Константы аффинности получали из кинетических констант скорости путем аппроксимации 1:1 моделью связывания Ленгмюра, используя программное обеспечение Biaeval (GE Healthcare). Измерение проводили в трех повторах с независимыми серийными разведениями.

Следующие образцы анализировали в отношении связывания с Fc человека (P329G) (таблица 3).

Таблица 3. Описание образцов, анализируемых в отношении связывания с Fc человека (P329G).

Связующий фрагмент	ID TAPIR	Формат
Антитело к P329G (M-1.7.24) (исходное)	P1AE9963	IgG, супернатант/очищенный
Антитело к P329G (VH3VL1)	P1AE9957	IgG, супернатант/очищенный
Антитело к P329G (VH1VL1)	P1AE9955	IgG, супернатант/очищенный
Антитело к P329G (VH2VL1)	P1AE9956	IgG, супернатант/очищенный
Антитело к P329G (VH4VL1)	P1AE9958	IgG, супернатант
Антитело к P329G (VH1VL2)	P1AE9959	IgG, супернатант
Антитело к P329G (VH1VL3)	P1AE9960	IgG, супернатант
Fc человека (P329G)	P1AD9000-004	Антиген, используемый в качестве анализа

5

Fc человека (P329G) получали расщеплением плазмином IgG1 человека с последующей аффинной очисткой с помощью белка А и эксклюзионной хроматографией.

Связывание исходного и шести гуманизованных вариантов связующего P329G фрагмента M-1.7.24 с Fc человека (P329G)

10

Фазу диссоциации подгоняли к одной кривой для облегчения характеристики скорости диссоциации. Рассчитывали соотношение между уровнем связывания и захвата. (таблица 4).

Таблица 4. Оценка связывания шести гуманизованных вариантов в отношении связывания с Fc человека (P329G).

15

Связующий фрагмент	ID TAPIR	кд (1/с)	Соотношение связывание/захват	Связывание
Антитело к P329G (M-1.7.24) (исходное)	P1AE9963-001	5,73E-03	20	исходное
Антитело к P329G (VH3VL1)	P1AE9957-001	5,49E-03	20	как исходное
Антитело к P329G (VH1VL1)	P1AE9955-001	3,88E-03	20	как исходное
Антитело к P329G (VH2VL1)	P1AE9956-001	2,79E-03	23	как исходное
Антитело к P329G (VH4VL1)	P1AE9958-001	1,11E-02	19	уменьшенное
Антитело к P329G (VH1VL2)	P1AE9959-001	7,86E-03	10	уменьшенное

Связывающий фрагмент	ID TAPIR	кд (1/с)	Соотношение связывание/захват	Связывание
Антитело к P329G (VH1VL3)	P1AE9960-001	1,29E-01	3	уменьшенное

Аффинность исходного и трех гуманизованных вариантов связывающего P329G фрагмента M-1.7.24 с Fc человека (P329G)

5 Три гуманизованных варианта с профилем связывания, сходным с исходным, оценивали более подробно. Кинетические константы для связывания Ленгмюра в соотношении 1:1 приведены в таблице 5.

Таблица 5. Кинетические константы (связывание Ленгмюра 1:1). Среднее значение и стандартное отклонение (в скобках) независимой тройной повторности (независимые серии разведений в одном цикле).

Связывающий фрагмент	ID TAPIR	ka (1/Мс)	кд (1/с)	КД (М)	Rmax (OE)
Антитело к P329G (M-1.7.24) (исходное)	P1AE9963-003	5,03E+05 (4,75 E+04)	1,58E-03 (3,8 E-05)	3,17E-09 (3,7 E-10)	44 (2)
Антитело к P329G (VH3VL1)	P1AE9957-003	2,74E+05 (5,51 E+03)	1,44E-03 (7,51 E-05)	5,27E-09 (3,3 E-10)	55 (3)
Антитело к P329G (VH1VL1)	P1AE9955-003	2,83E+05 (7,94 E+03)	1,20E-03 (4,73 E-05)	4,24E-09 (2,5 E-10)	48 (2)
Антитело к P329G (VH2VL1)	P1AE9956-003	2,53E+05 (3,79 E+03)	1,22E-03 (3,61 E-05)	4,81E-09 (2,1 E-10)	54 (5)

10

Заключение

15 Получали шесть гуманизованных вариантов. Три из них (VH4VL1, VH1VL2, VH1VL3) показали уменьшенное связывание с Fc человека (P329G) по сравнению с исходным M-1.7.24. Три других гуманизованных варианта (VH1VL1, VH2VL1, VH3VL1) имеют кинетику связывания, очень похожую на исходный связывающий фрагмент, и не утрачивают аффинности при гуманизации.

Пример 2

Получение гуманизованных антигенсвязывающих рецепторов к P329G

20 Для оценки функциональности гуманизованных вариантов P329G различные переменные домены тяжелой (VH) и легкой цепи (VL) последовательностей ДНК, кодирующих связывающий фрагмент, специфичный для

Fc-мутации P329G, клонировали как одноцепочечный переменный фрагмент связующих фрагментов (scFv) и использовали в качестве антигенсвязывающего домена в химерном антигенном рецепторе второго поколения (CAR).

Различные гуманизированные варианты связующего P329G фрагмента содержат переменный главный домен тяжелой цепи (VL) Ig и переменный домен легкой цепи (VL) Ig. VH и VL соединены через линкер (G4S)₄. Антигенсвязывающий домен scFv был слит с якорным трансмембранным доменом (ATD) CD8a (Uniprot P01732[183-203]), который слит с внутриклеточным костимулирующим сигнальным доменом (CSD) CD137 (Uniprot Q07011AA 214-255), который в свою очередь сливается со стимулирующим сигнальным доменом (SSD) CD3ζ (Uniprot P20963 AA 52-164). scFv CAR к P329G был сконструирован в двух различных ориентациях VHxVL (Фиг. 1A) или VLxVH (Фиг. 1B). Графическое представление типового экспрессионного конструкта и (включая репортер GFP) для конфигурации VHVL показано на Фиг. 1C и для конфигурации VLVH на Фиг. 1D.

Пример 3

Экспрессия антигенсвязывающих рецепторов к P329G в клетках Jurkat-NFAT

Различные гуманизированные антигенсвязывающие рецепторы к P329G с помощью вируса трансдуцировали в клетки Jurkat (GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega №CS176501).

Экспрессию антигенсвязывающего рецептора к P329G оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки Jurkat, использующие различные гуманизированные антигенсвязывающие рецепторы к P329G, собирали, промывали ФСБ и высевали по 50000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с плоским дном. После окрашивания в течение 45 мин. в темноте и холодильнике (4-8°C) различными концентрациями (500 нМ-0 нМ серийные разведения 1:5) антитела, содержащего мутацию P329G в Fc-домене, образцы трижды промывали FACS-буфером (ФСБ, содержащий 2% FBS, 10% 0,5 М ЭДТА, pH 8 и 0,5 г/л NaN₃). Затем образцы окрашивали 2,5 мкг/мл поликлонального IgG, специфичного к Fcγ-фрагменту человека, и PE-конъюгированным AffiniPure фрагментом F (ab')₂ козьего антитела в течение 30 мин. в темноте в холодильнике, анализировали с помощью проточной цитометрии (Fortessa BD).

Кроме того, антигенсвязывающие рецепторы к P329G содержали внутриклеточный репортер GFP (смотрите Фиг. 1C).

По сравнению с гуманизированными версиями (VH1VL1, VH2VL1 и VH3VL1) связующего P329G фрагмента исходный негуманизированный связующий фрагмент показывает слабое мечение CAR на клеточной поверхности (Фиг. 2A), хотя экспрессия GFP является сравнимой. Интересно, что конструкт VL1VH1 (смотрите Фиг. 1D) показывает высокую экспрессию GFP, но также слабое мечение CAR на клеточной поверхности, что указывает на то, что это неблагоприятная конформация связующего фрагмента.

В целом, неожиданно, версия VH3VL1 показывает самую высокую экспрессию GFP и экспрессию CAR на поверхности. Кроме того, все испытанные конструкты в конформации VHVL (VH1VL1, VH2VL1 и VH3VL1) показывают усиленный сигнал GFP при трансдукции в Т-клетки Jurkat по сравнению с исходным негуманизированным антигенсвязывающим рецептором P329G и, что интересно, конструктом в конформации VLVH (VL1VH3).

В заключение, конформация VHVL, по-видимому, способствует уровням экспрессии антигенсвязывающих рецепторов, а также правильному нацеливанию на клеточную поверхность.

Чтобы дополнительно охарактеризовать селективность, специфичность и безопасность гуманизированных антигенсвязывающих рецепторов к P329G, были проведены различные тесты.

Пример 4

Специфическая активация Т-клеток в присутствии нацеливающего антитела, содержащего мутацию P329G в Fc-домене

Чтобы исключить неспецифическое связывание различных гуманизированных вариантов анти-P329G-scFv, клетки Jurkat NFAT, экспрессирующие антигенсвязывающие рецепторы, содержащие эти варианты, оценивали на предмет их активации в присутствии CD20-положительных клеток-мишеней WSUDLCL2 и антител к CD20 (GA101) с различными Fc вариантами (Fc дикого типа, мутация Fc P329G, мутация LALA, мутация D246A или их комбинации). Анализ активации CAR-Jurkat NFAT проводили, как описано выше, и анти-CD20 (GA101) IgG1 дикого типа (Фиг. 3A), анти-CD20 (GA101) P329G LALA IgG1 (Фиг. 3B), анти-CD20 (GA101) LALA IgG1 (Фиг. 3D), анти-CD20 (GA101) D246A P329G IgG1 (Фиг. 3F) или неспецифический DP-

47 P329G LALA IgG1 (Фиг. 3E) использовали для оценки потенциала неспецифического связывания. Неспецифическая активация CAR к P329G не была обнаружена для анти-CD20 (GA101) IgG1 дикого типа (Фиг. 3A), анти-CD20 (GA101) LALA IgG1 (Фиг. 3D) или неспецифического DP-47 P329G LALA IgG1 (Фиг. 3E).

5 Специфическую активацию CAR к P329G можно было обнаружить в присутствии анти-CD20 (GA101) P329G LALA IgG1 (Фиг. 3B) и анти-CD20 (GA101) D246A P329G IgG1 (Фиг. 3F). Оцененная EC_{50} была сравнима между всеми гуманизированными вариантами антитела к P329G и не отличалась от EC_{50} исходного связующего фрагмента.

10 Интересно, что антигенсвязывающие рецепторы, содержащие связующие фрагменты scFv в конформации VHVL, приводят к более сильной активации Т-клеток Jurkat NFAT по сравнению с исходным негуманизированным связующим фрагментом и гуманизированным связующим фрагментом в конформации VLVH. Более высокое плато (смотрите, например, Фиг. 3F) может быть связано с 15 улучшенными уровнями экспрессии и/или улучшенным транспортом к клеточной поверхности антигенсвязывающих рецепторов, что приводит к более сильной активации. Более того, конформация может влиять на связывание с мутацией P329G.

20 Чтобы исследовать риск потенциальной кластеризации антигенсвязывающего домена, что приводит к тонической передаче сигналов или неспецифической активации Т-клеток, анализ активации Jurkat NFAT проводили, как описано выше, тогда как начальная концентрация используемого антитела была повышенной, а серийное разведение начинались со 100 нМ 25 GA101 P329G LALA IgG1 и далее клетки-мишени не высевали.

Как показано на Фиг. 3C, для всех протестированных гуманизированных вариантов P329G не было обнаружено никакой активации, что указывает на обнаруживаемую кластеризацию рецепторов или неспецифическую активацию в отсутствие клеток-мишеней.

Пример 5

Чувствительность различных вариантов гуманизованного антигенсвязывающего рецептора к P329G, оцениваемая по активации Т-клеток на клетках-мишенях, экспрессирующих различные уровни антигена

5 Чтобы дополнительно охарактеризовать чувствительность и селективность гуманизованных антигенсвязывающих рецепторов к P329G, анализ активации Jurkat NFAT проводили, как описано выше.

Репортерные клетки Jurkat NFAT, экспрессирующие различные антигенсвязывающие рецепторы гуманизованного варианта к P329G-scFv, 10 оценивали на предмет их способности различать высокие (HeLa-FolR1), средние (Skov3) и низкие (HT29) FolR1-положительные клетки-мишени. Различные варианты связывающего P329G фрагмента использовали в качестве каркаса для распознавания антигена scFv в клеточной линии Jurkat-Reporter в комбинации с антителами, которые представляют высокий уровень аффинности (16D5) (Фиг. 4 15 A, D, G), средний уровень аффинности (16D5 W96Y) (Фиг. 4 B, E, H) или низкий уровень аффинности (16D5 G49S/K53A) (Фиг. 4 C, F, I) к FolR1. Клетки-мишени HeLa-FolR1 с высоким уровнем экспрессии в сочетании с высоким уровнем аффинности анти-FolR1 16D5 (Фиг. 4 A), средним уровнем аффинности анти-FolR1 16D5 W96Y (Фиг. 4 B) и низким уровнем аффинности адаптора-IgG анти- 20 FolR1 G49S K53A (Фиг. 4 C) показали дозозависимую активацию. Среда, экспрессирующая клетки-мишени Skov3, в сочетании с высоким уровнем аффинности анти-FolR1 16D5 (Фиг. 4 D), средним уровнем аффинности анти-FolR1 16D5 W96Y (Фиг. 4 E) и низким уровнем аффинности адаптора-IgG анти-FolR1 G49S K53A (Фиг. 4 F) показала дозозависимую активацию. Для клеток- 25 мишеней с низкой экспрессией HT29 в сочетании со связывающим фрагментом с различной аффинностью анти-FolR1 16D5 (Фиг. 4 G), анти-FolR1 16D5 W96Y (Фиг. 4 H) или низким уровнем аффинности адаптора-IgG анти-FolR1 G49S K53A (Фиг. 4 I) не было обнаружено никакого сигнала. Более того, интересно, что антигенсвязывающие рецепторы в формате VHVL приводят к более высокой 30 активации Т-клеток Jurkat NFAT по сравнению с исходным негуманизованным связывающим фрагментом и гуманизованным связывающим фрагментом в формате VLVH. Связывающий фрагмент scFv гуманизованного варианта VH3VL1 дает самую высокую интенсивность сигнала среди всех конструкторов (Фиг. 4 A-F).

Более того, анализ активации Jurkat NFAT проводили на клетках HeLa (FolR1⁺ и HER2⁺), используемых в комбинации либо с анти-FolR1 16D5 P329G LALA IgG1 (Фиг. 5), либо с анти-HER2 P329G LALA IgG1 (Фиг. 6). Оба подтверждают вывод о том, что ориентация VHVL лучше, чем ориентация VLVH. Гуманизированный вариант VH3VL1 приводит к наиболее сильной активации Т-клеток Jurkat NFAT.

Пример 6

Экспрессия дополнительных антигенсвязывающих рецепторов к P329G в клетках Jurkat-NFAT

Дисульфидный гуманизированный антигенсвязывающий рецептор к P329G с помощью вируса трансдуцировали в клетки Jurkat (GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega №CS176501). Экспрессию антигенсвязывающего рецептора к P329G оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки Jurkat, использующие стабилизированный дисульфидом гуманизированный антигенсвязывающий рецептор к P329G, собирали, промывали ФСБ и высевали по 50000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с плоским дном. После окрашивания в течение 45 мин. в темноте и холодильнике (4-8°C) различными концентрациями (600 нМ-0 нМ серийные разведения 1:10) антитела, содержащего мутацию P329G в Fc-домене, образцы трижды промывали FACS-буфером (ФСБ, содержащий 2% FBS, 10% 0,5 М ЭДТА, pH 8 и 0,5 г/л NaN₃). Затем образцы окрашивали 2,5 мкг/мл поликлонального IgG, специфичного к Fcγ-фрагменту человека, и PE-конъюгированным AffiniPure фрагментом F (ab')₂ козьего антитела в течение 30 мин. в темноте в холодильнике и анализировали с помощью проточной цитометрии (Fortessa BD). Кроме того, антигенсвязывающие рецепторы к P329G содержали внутриклеточный репортер GFP (смотрите Фиг. 1C). CAR-экспрессию нормализовали по сигналу GFP.

По сравнению с гуманизированными версиями VH3VL1 и VL1VH3 связующий P329G фрагмент, стабилизированный дисульфидом, демонстрирует сопоставимое мечение CAR на клеточной поверхности (Фиг. 7).

Пример 7

Экспрессия дополнительных антигенсвязывающих рецепторов к P329G в клетках HEK293-T

Для проверки экспрессии конструкторов CAR HuR968B и HuR9684M 1,5x10⁶ клеток HEK293-T высевали в 6-луночный планшет и через 8-24 часа

трансфицировали смесью PEI (Polyscience, 24765)/хлорида натрия (Baxter, АБЕ1307), содержащей 2 мкм CAR, кодирующую плазмидную ДНК (1 мкг/мкл). После 48-часового периода культивирования супернатант культуры НЕК293Т отбрасывали и клетки НЕК293Т анализировали на экспрессию CAR с использованием проточной цитометрии. Поэтому 3×10^5 клеток НЕК293Т/на лунку переносили в 96-луночный планшет и дважды промывали буфером FACS (5 мин., 300 г). В качестве первичного антитела Alexa Fluor 647-WT IgG или Alexa Fluor 647-PG IgG разводили в буфере FACS для получения рабочего раствора, разбавленного 1:50. Клетки НЕК293Т суспендировали в этом растворе антител и окрашивали при 4°C в течение 30 мин. После промывания буфером FACS (5 мин., 300 г) клетки фиксировали в течение 20 мин. с использованием 3% фиксационного раствора (Thermo Scientific Cat.: 28908). Затем клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на предмет мечения GFP и APC. Оба, HuR968B и HuR9684M CAR, могут быть успешно экспрессированы и обнаружены в Т-клетках НЕК239 (Фиг. 9).

Пример 8

Экспрессия дополнительных антигенсвязывающих рецепторов к P329G в Т-клетках

Т-клетки CAR получали с помощью лентивирусной трансдукции, и экспрессию CAR подтверждали с помощью проточной цитометрии. Для обнаружения CAR соответствующее количество трансдуцированных Т-клеток промывали один раз буфером FACS, 300 × г, 5 мин. Добавляли буфер FACS, содержащий LIVE/DEAD фиксируемые мертвые клетки и фрагмент биотина-SP (длинный спейсер) AffiniPure F(ab')₂ козьего анти-человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch, 109-066-006) и клетки окрашивали при 4°C в течение 30~45 мин. После этого клетки дважды промывали и добавляли соответствующие антитела: PerCP-Cy5.5-CD3 (BD, 560835), BUV805-CD8 (BD, 749366), APC стрептавидин (Biolegend, 405207) и окрашивали при 4°C в течение 30~45 мин. После инкубации клетки дважды промывали буфером FACS, ресуспендировали и оценивали с помощью проточной цитометрии. Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. После гейтирования CD3⁺ клеток, напоминающих популяцию Т-клеток, процент CAR Т-положительных клеток был обнаружен как 27% для HuR9684M и 18% для HuR968B (Фиг. 10B).

Пример 9

Специфическое уничтожение Т-клеток, индуцированное антигенсвязывающими рецепторами анти-P329G HuR968B и HuR9684M и IgG A6, содержащим мутацию P329G

5 Т-клетки, экспрессирующие CAR HuR968B или HuR9684M, получали от донора крови (PCH20201100004) и сравнивали в анализе уничтожения с использованием DAN-G18.2 в качестве клеток-мишеней и IgG A6 PG или A6 WT (VH/VL SEQ ID NO: 136/137 и мутация P329G в Fc, как, например, SEQ ID NO:55) для вовлечения клаудина 18.2 на поверхности клетки-мишени. Клетки-
10 мишени и эффекторные клетки засеивали в соотношении Э:М=1:2 либо 100 нг/мл IgG PG, либо IgG WT. Уничтожение клеток-мишеней измеряли с помощью xCELLigence в течение 60 ч. (Фиг. 11A и B).

Даже в присутствии P329G и антитела A6 WT нетрансдуцированные клетки UNT не оказывали уничтожающего эффекта. CAR Т-клетки HuR968B и
15 HuR9684M индуцировали мощный лизис опухолевых клеток при инкубации с PG IgG (Фиг. 11A). При инкубации с контрольным IgG WT, в котором отсутствует мутация PG, гибели клеток не наблюдалось (Фиг. 11B).

Пример 10

Специфическое уничтожение Т-клеток, индуцированное антигенсвязывающим рецептором к P329G HuR9684M и A6 и Zmab IgG, содержащим мутацию P329G

CAR-Т-клетки HuR968B совместно культивировали в течение 24 ч. в присутствии различных концентраций антител A6 PG IgG и Zmab PG IgG (VH/VL SEQ ID NO: 136/137 или 138/139 и мутация P329G в Fc, как, например,
25 SEQ ID NO:55), обе нацелены на клаудин 18.2. Соотношение Э:М составляло 1:1. Анализ проводили в 96-луночном круглодонном планшете, и через 24 часа в супернатанте соответствующих лунок наблюдали высвобождение ЛДГ, а цитотоксичность рассчитывали в соответствии с предложениями производителя (нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96 Promega G1780). Оба PG
30 IgG демонстрируют мощный лизис клеток-мишеней DAN-G18.2, которые экспрессируют высокий уровень клаудина 18.2 (Фиг. 12).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%,
5 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:129.
2. Антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129.
3. Антигенсвязывающий рецептор, состоящий из аминокислотной
10 последовательности SEQ ID NO:129.
4. Антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 95%,
96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:132.
- 15 5. Антигенсвязывающий рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:132.
6. Антигенсвязывающий рецептор, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:132.
7. Антигенсвязывающий рецептор по любому из пп. 1-6, причем
20 антигенсвязывающий рецептор не содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.
8. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий рецептор по любому из пп. 1-7.
9. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID
25 NO:130.
10. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 133.
11. Полипептид, кодируемый выделенным полинуклеотидом по любому из пп. 8-10.
- 30 12. Вектор, в частности вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 8-10.
13. Трансдуцированная Т-клетка, содержащая полинуклеотид, по любому из пп. 8-10 или вектор по п. 12.

14. Трансдуцированная Т-клетка, способная экспрессировать антигенсвязывающий рецептор по любому из пп. 1-7.

15. Набор, содержащий:

(А) трансдуцированную Т-клетку, способную экспрессировать антигенсвязывающий рецептор по любому из пп. 1-7; и

(В) антитело, которое связывается с антигеном клетки-мишени, и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

16. Набор, содержащий:

(А) выделенный полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий рецептор по любому из пп. 1-7; и

(В) антитело, которое связывается с антигеном клетки-мишени, и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

17. Набор, содержащий:

(А) выделенный полинуклеотид, по любому из пп. 8-10 или вектор по п. 12; и

(В) антитело, которое связывается с антигеном клетки-мишени, и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

18. Набор по любому из пп. 15-17, в котором Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1 или IgG4, в частности Fc-домен IgG1 человека.

19. Набор по любому из пп. 15-18, в котором антиген клетки-мишени выбран из группы, состоящей из белка активации фибробластов (FAP), карциноэмбрионального антигена (CEA), мезотелина (MSLN), CD20, фолатного рецептора 1 (FOLR1) и тенасцина (TNC).

20. Набор по любому из пп. 15-19 для применения в качестве лекарственного средства.

21. Антигенсвязывающий рецептор по любому из пп. 1-7 или трансдуцированная Т-клетка по п. 13 или п. 14 для применения в качестве лекарственного средства, причем трансдуцированную Т-клетку, экспрессирующую антигенсвязывающий рецептор вводят до, одновременно с или после введения антитела, которое связывается с антигеном клетки-мишени,

в частности, антигеном раковой клетки, и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

22. Набор по любому из пп. 15-19 для применения в лечении заболевания, в частности для применения в лечении рака.

5 23. Антигенсвязывающий рецептор по любому из пп. 1-7 или трансдуцированная Т-клетка по п. 13 или п. 14 для применения в лечении рака, причем лечение включает введение трансдуцированной Т-клетки, экспрессирующей антигенсвязывающий рецептор до, одновременно с или после введения антитела, которое связывается с антигеном раковой клетки, и которое
10 содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

 24. Антигенсвязывающий рецептор, трансдуцированная Т-клетка или набор для применения по п. 22 или п. 23, причем указанный рак выбран из рака эпителиального, эндотелиального или мезотелиального происхождения и рака
15 крови.

 25. Антигенсвязывающий рецептор, трансдуцированная Т-клетка или набор для применения по п. 24, причем раковый антиген выбран из группы, состоящей из белка активации фибробластов (FAP), карциноэмбрионального антигена (CEA), мезотелина (MSLN), CD20, фолатного рецептора 1 (FOLR1) и
20 тенасцина (TNC).

 26. Антигенсвязывающий рецептор, трансдуцированная Т-клетка или набор для применения по любому из пп. 23-25, причем трансдуцированная Т-клетка получена из клетки, выделенной от субъекта, подлежащего лечению.

 27. Антигенсвязывающий рецептор, трансдуцированная Т-клетка или
25 набор для применения по любому из пп. 23-26, причем трансдуцированная Т-клетка не получена из клетки, выделенной от субъекта, подлежащего лечению.

 28. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту трансдуцированной Т-клетки, способной экспрессировать антигенсвязывающий рецептор по любому из пп. 1-7, и введение до,
30 одновременно с или после введения трансдуцированной Т-клетки терапевтически эффективного количества антитела, которое связывается с антигеном клетки-мишени и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

29. Способ по п. 28, дополнительно включающий выделение Т-клетки от субъекта и получение трансдуцированной Т-клетки путем трансдукции выделенной Т-клетки полинуклеотидом по любому из пп. 8-10 или вектором по п. 12.

5 30. Способ по п. 29, в котором Т-клетку трансдуцируют ретровирусным или лентивирусным векторным конструктом или невирусным векторным конструктом.

31. Способ по любому из пп. 28-30, в котором трансдуцированную Т-клетку вводят субъекту путем внутривенной инфузии.

10 32. Способ по любому из пп. 28-31, в котором трансдуцированную Т-клетку приводят в контакт антителами к CD3 и/или к CD28 перед введением субъекту.

15 33. Способ по любому из пп. 28-32, в котором трансдуцированную Т-клетку приводят в контакт по меньшей мере с одним цитокином перед введением субъекту, предпочтительно интерлейкином-2 (IL-2), интерлейкином-7 (IL-7), интерлейкином-15 (IL-15) и/или интерлейкином-21 или их вариантами.

34. Способ по любому из пп. 28-33, причем заболевание представляет собой рак.

20 35. Способ по п. 34, причем рак выбран из рака эпителиального, эндотелиального или мезотелиального происхождения и рака крови.

25 36. Способ индукции лизиса клетки-мишени, включающий приведение в контакт клетки-мишени с трансдуцированной Т-клеткой, способной экспрессировать антигенсвязывающий рецептор по любому из пп. 1-7, в присутствии антитела, которое связывается с антигеном клетки-мишени и которое содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную мутацию P329G в соответствии с нумерацией EU.

37. Способ по п. 36, причем клетка-мишень представляет собой раковую клетку.

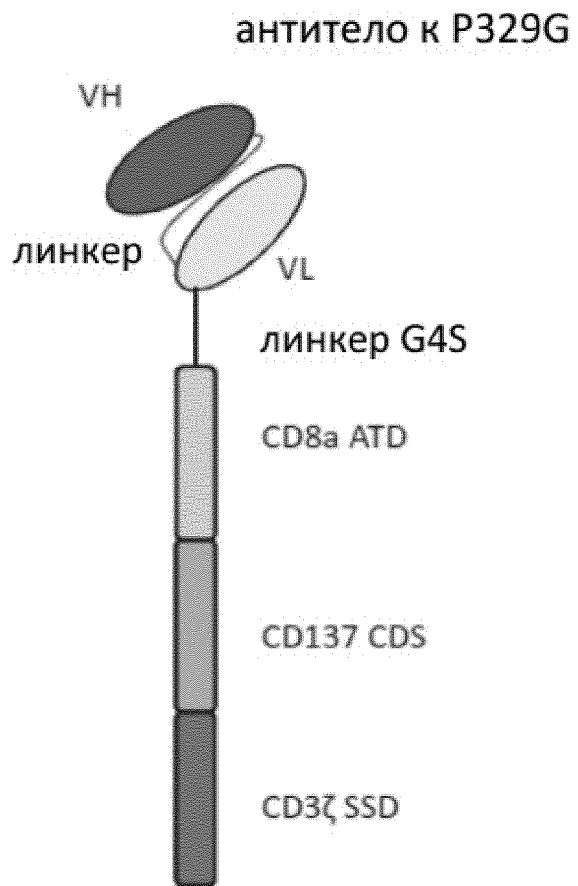
30 38. Способ по п. 36 или п. 37, причем клетка-мишень, экспрессирующая антиген, выбрана из группы, состоящей из белка активации фибробластов (FAP), карциноэмбрионального антигена (CEA), мезотелина (MSLN), CD20, фолатного рецептора 1 (FOLR1) и тенасцина (TNC).

39. Применение антигенсвязывающего рецептора по любому из пп. 1-7, полинуклеотида по любому из пп. 8-10 или трансдуцированной Т-клетки по п. 13 или п. 14 в производстве лекарственного средства.

5 40. Применение по п. 39, причем лекарственное средство предназначено для лечения рака.

41. Применение по п. 40, характеризующееся тем, что указанный рак выбран из рака эпителиального, эндотелиального или мезотелиального происхождения и рака крови.

Фигура 1А



анти-P329G CAR

Фигура 1В



анти-P329G CAR

Фигура 1С

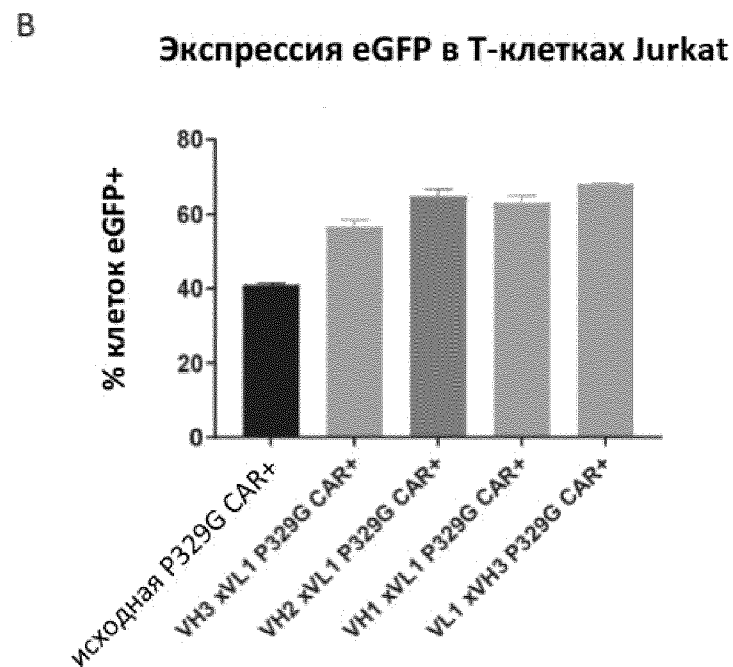
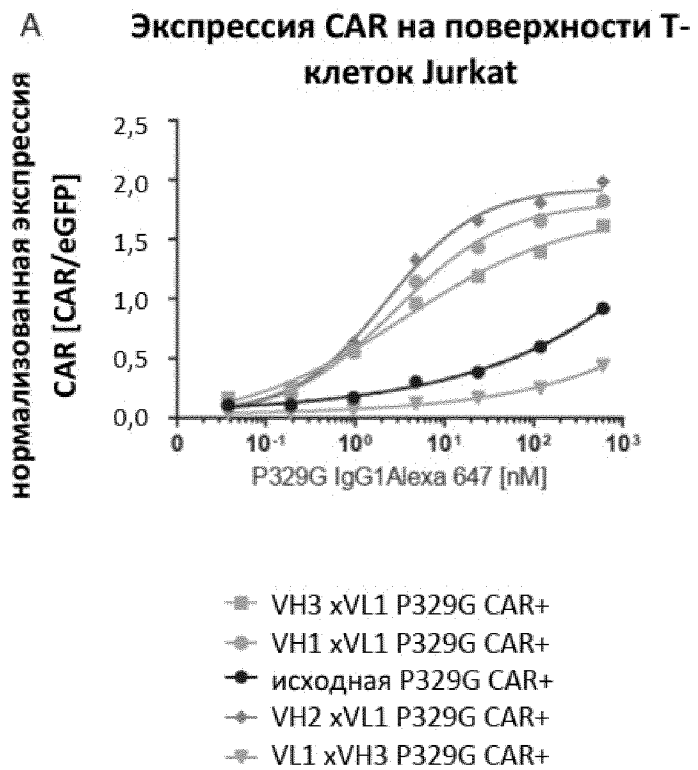


CMV = промотор цитомегаловируса
 SP = сигнальный пептид
 VH = переменная тяжелая цепь
 VL = переменная легкая цепь
 TM = трансмембранный домен
 IRES= внутренний сайт посадки рибосомы

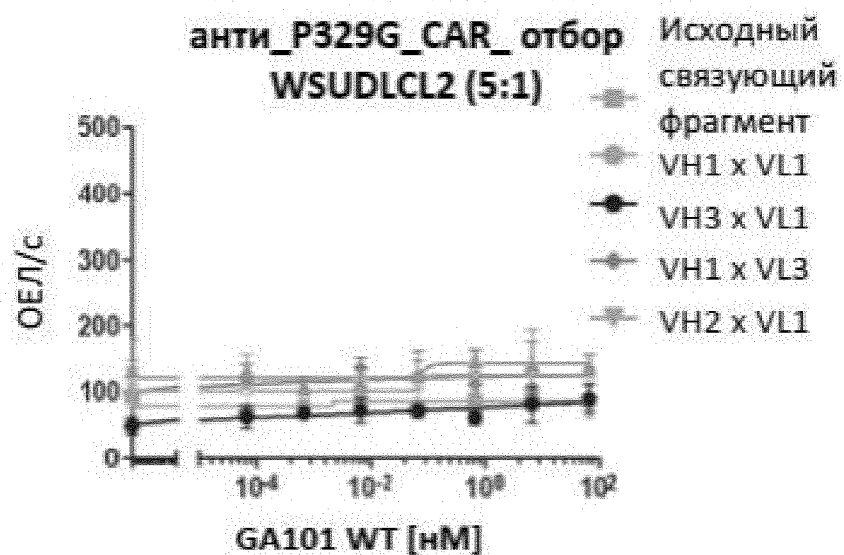
Фигура 1D



Фигура 2

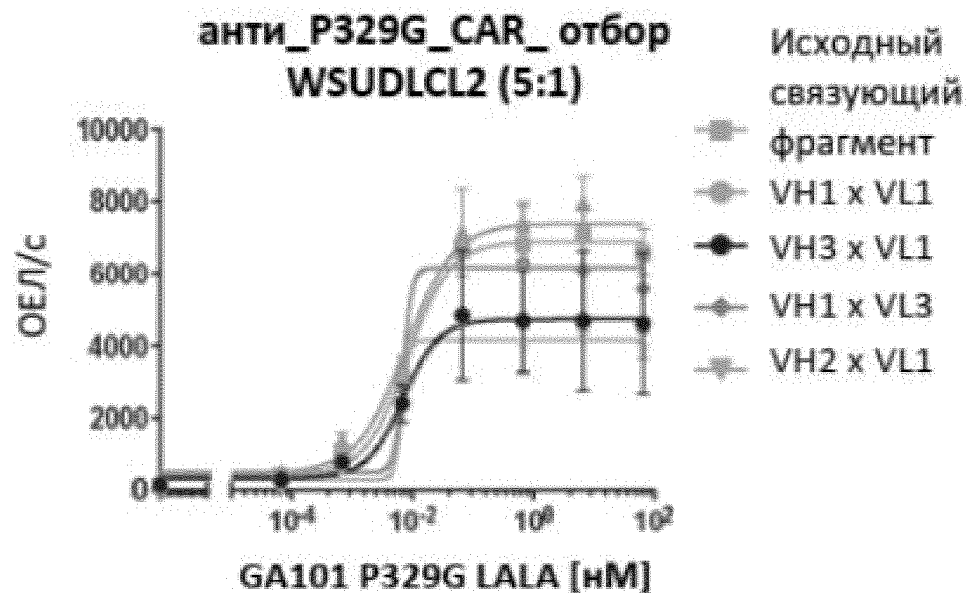


Фигура 3А



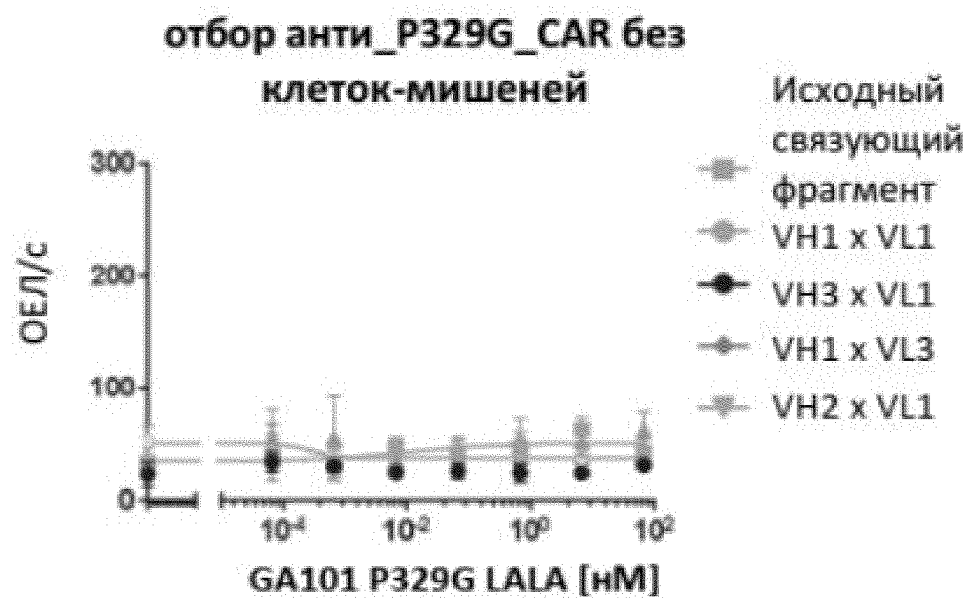
	EC50
Исходный связующий фрагмент	~ 1,907e+050
VH1 x VL1	~ 0,002187
VH3 x VL1	~ 0,08500
VL1 x VH3	~ 0,07828
VH2 x VL1	1,187e-007

Фигура 3В



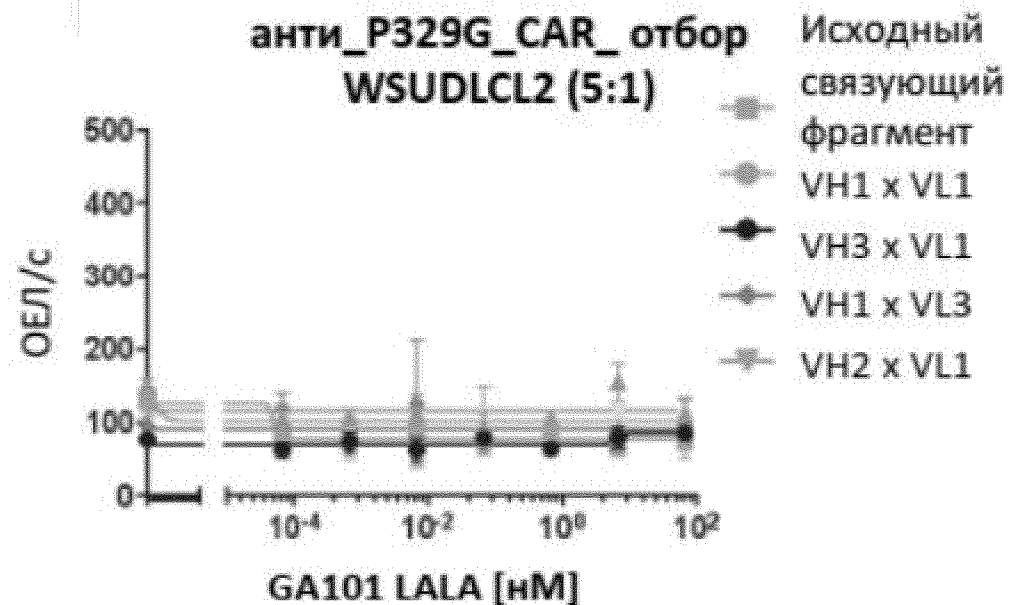
	EC50
Исходный связующий фрагмент	0,006995
VH1 x VL1	0,008099
VH3 x VL1	0,007570
VL1 x VH3	~ 0,006577
VH2 x VL1	~ 0,006932

Фигура 3С



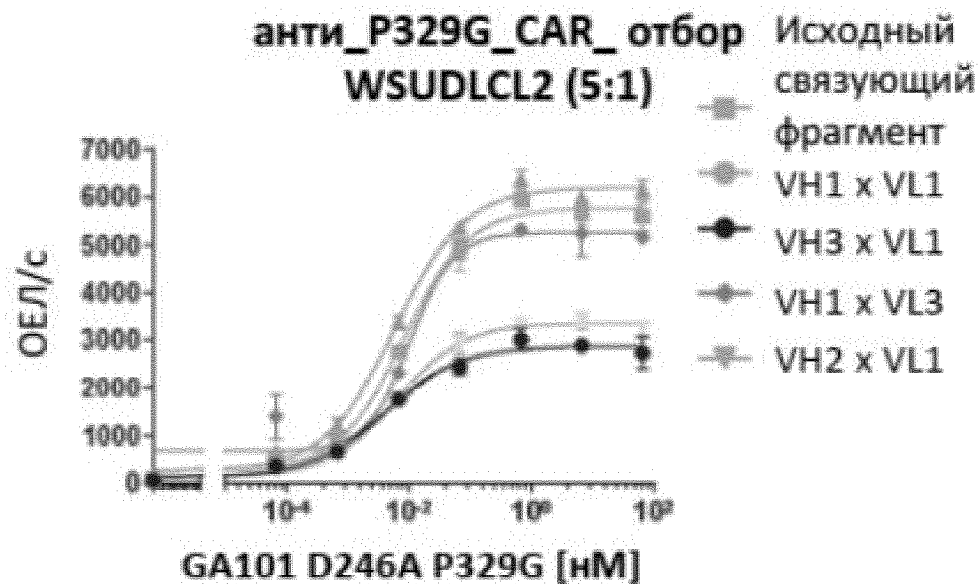
	EC50
Исходный связующий фрагмент	
VH1 x VL1	0,009863
VH3 x VL1	
VL1 x VH3	0,0002879
VH2 x VL1	

Фигура 3D



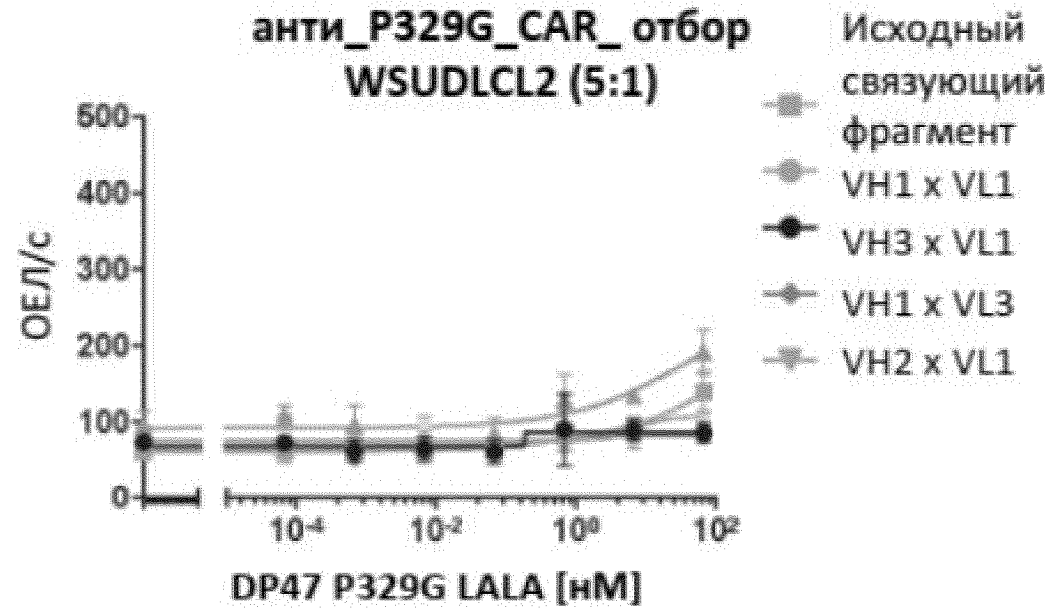
	EC50
Исходный связующий фрагмент	~ 6,320
VH1 x VL1	~ 4,847e-005
VH3 x VL1	~ 16088048288772
VL1 x VH3	~ 2,339e-007
VH2 x VL1	~ 0,000

Фигура 3Е



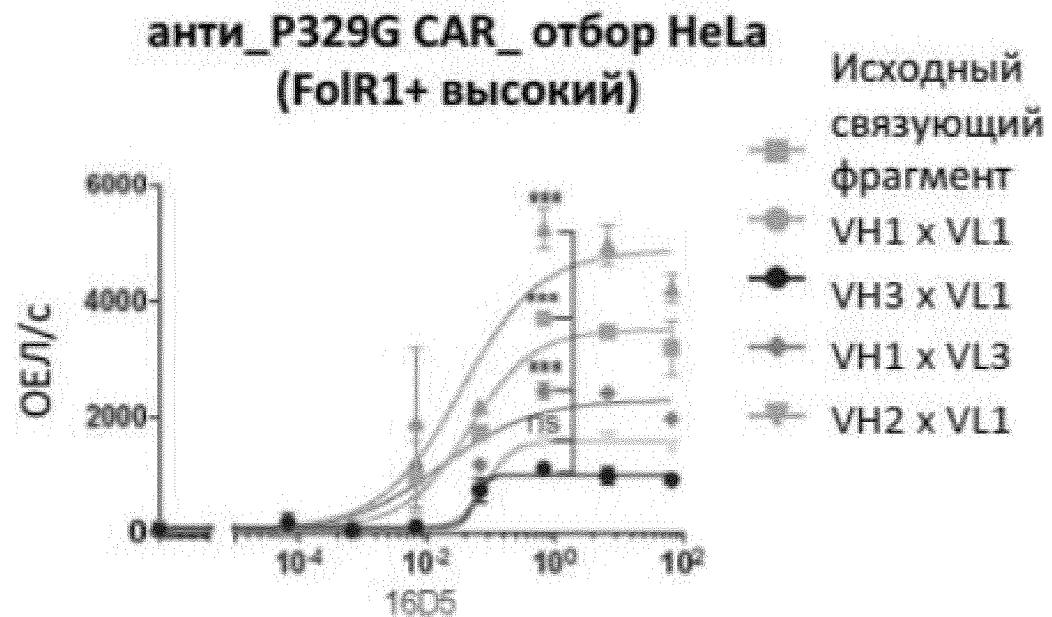
	EC50
Исходный связующий фрагмент	0,004193
VH1 x VL1	0,008139
VH3 x VL1	0,005823
VL1 x VH3	0,006188
VH2 x VL1	0,01042

Фигура 3F



	EC50
Исходный связующий фрагмент	0,1829
VH1 x VL1	~ 327243519
VH3 x VL1	43,24
VL1 x VH3	7,424
VH2 x VL1	0,2932

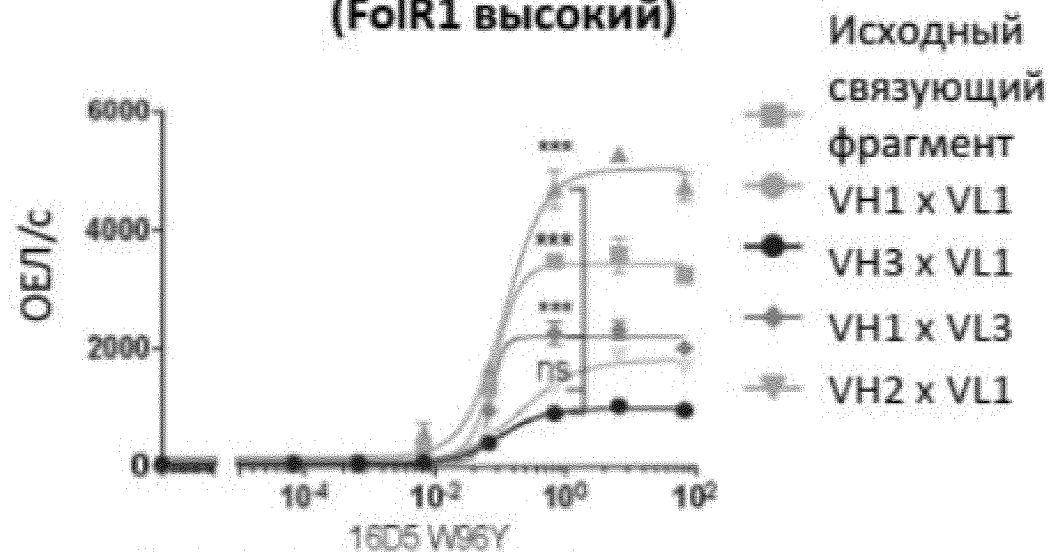
Фигура 4А



	EC50
Исходный связующий фрагмент	~ 0,05551
VH1 x VL1	0,04639
VH3 x VL1	0,03461
VL1 x VH3	0,08399
VH2 x VL1	0,01673

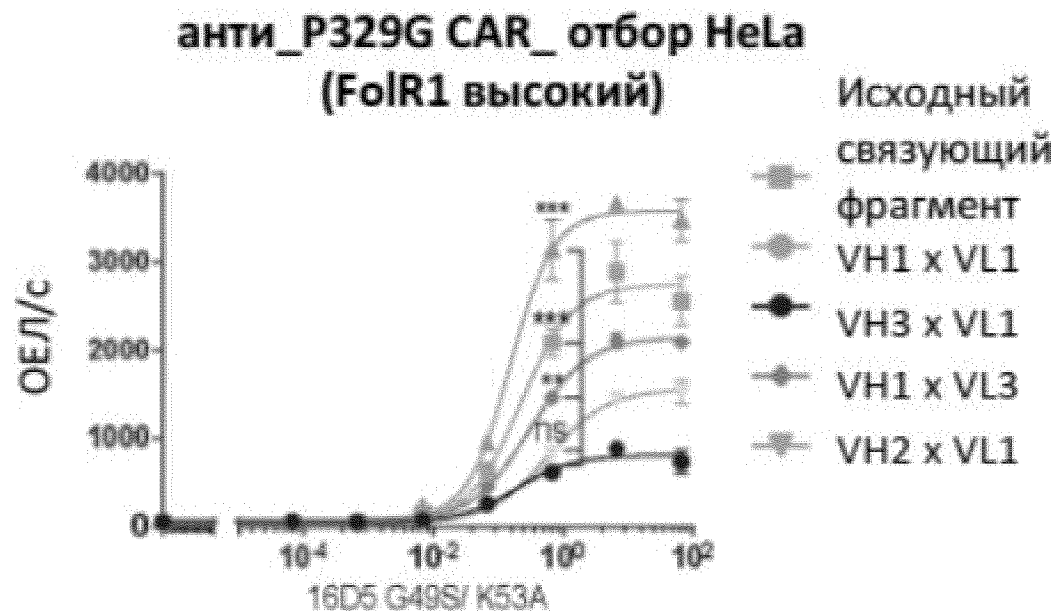
Фигура 4В

анти_P329G CAR_ отбор HeLa
(FoIR1 высокий)



	EC50
Исходный связующий фрагмент	0,09999
VH1 x VL1	0,08469
VH3 x VL1	0,1168
VL1 x VH3	0,2034
VH2 x VL1	~ 0,07242

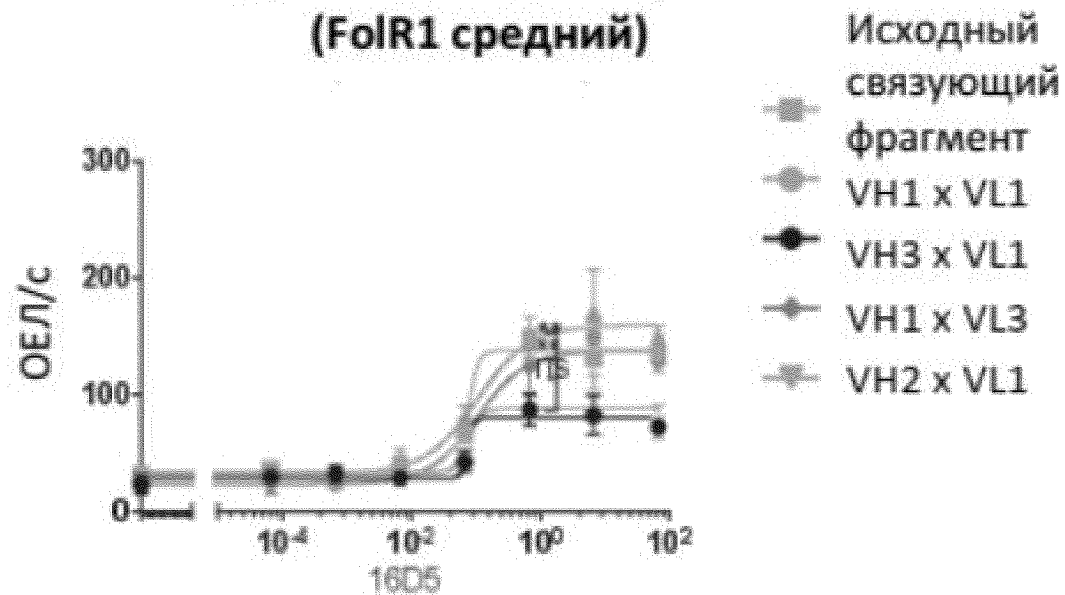
Фигура 4С



	EC50
Исходный связующий фрагмент	0,1925
VH1 x VL1	0,2221
VH3 x VL1	0,1535
VL1 x VH3	0,5814
VH2 x VL1	0,3039

Фигура 4D

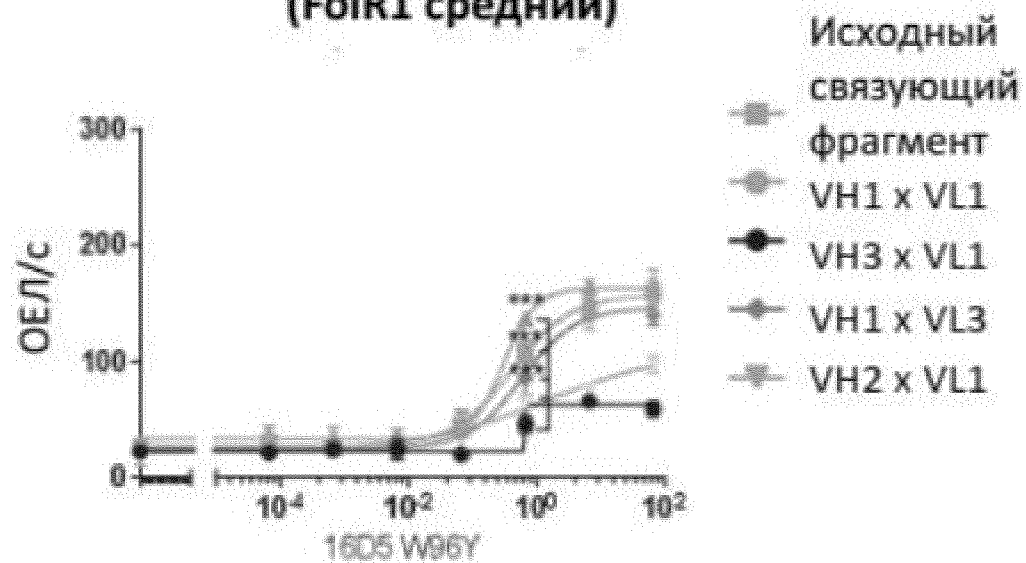
анти_P329G_CAR_отбор Skov3
(FolR1 средний)



	EC50
Исходный связующий фрагмент	~ 0,07453
VH1 x VL1	~ 0,07597
VH3 x VL1	0,1056
VL1 x VH3	~ 0,07672
VH2 x VL1	0,1048

Фигура 4Е

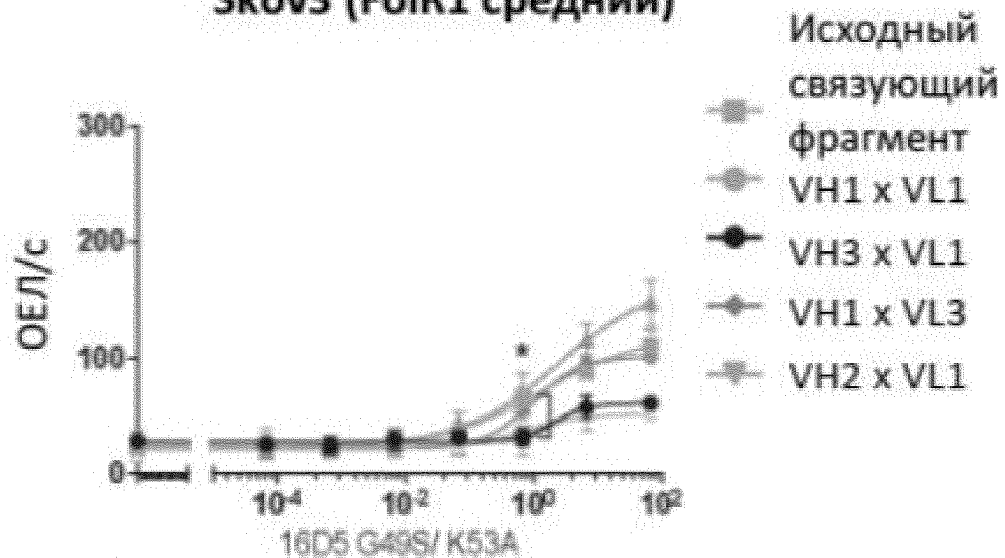
анти_P329G_CAR_отбор Skov3
(FolR1 средний)



	EC50
Исходный связующий фрагмент	~ 0,6653
VH1 x VL1	0,4107
VH3 x VL1	0,3086
VL1 x VH3	1,374
VH2 x VL1	0,5968

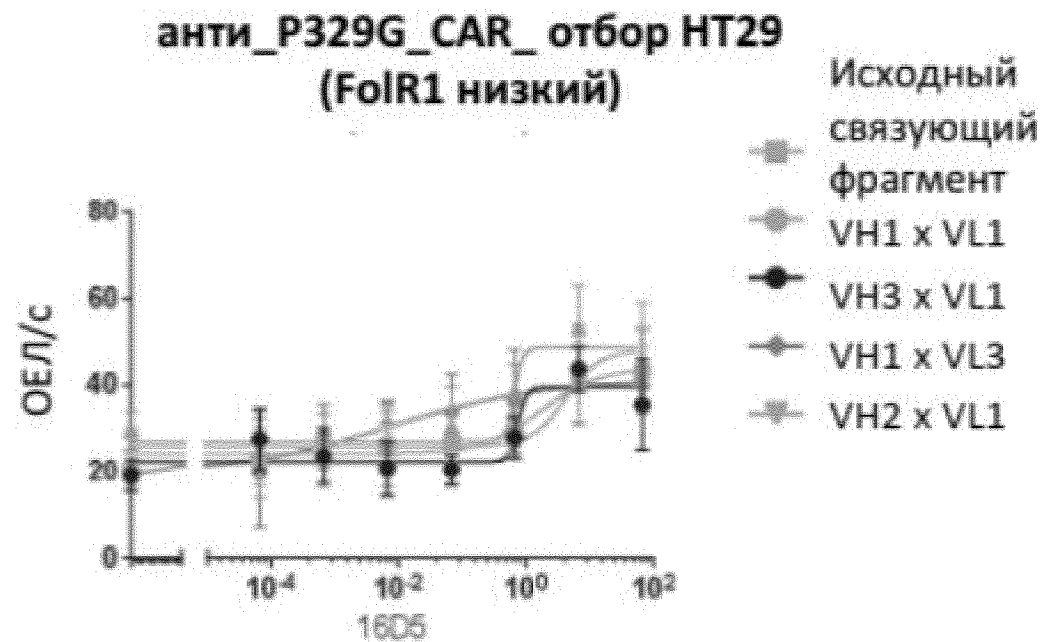
Фигура 4F

анти_P329G_CAR_отбор
Skov3 (FolR1 средний)



	EC50
Исходный связующий фрагмент	2,156
VH1 x VL1	1,204
VH3 x VL1	2,356
VL1 x VH3	0,7996
VH2 x VL1	0,9668

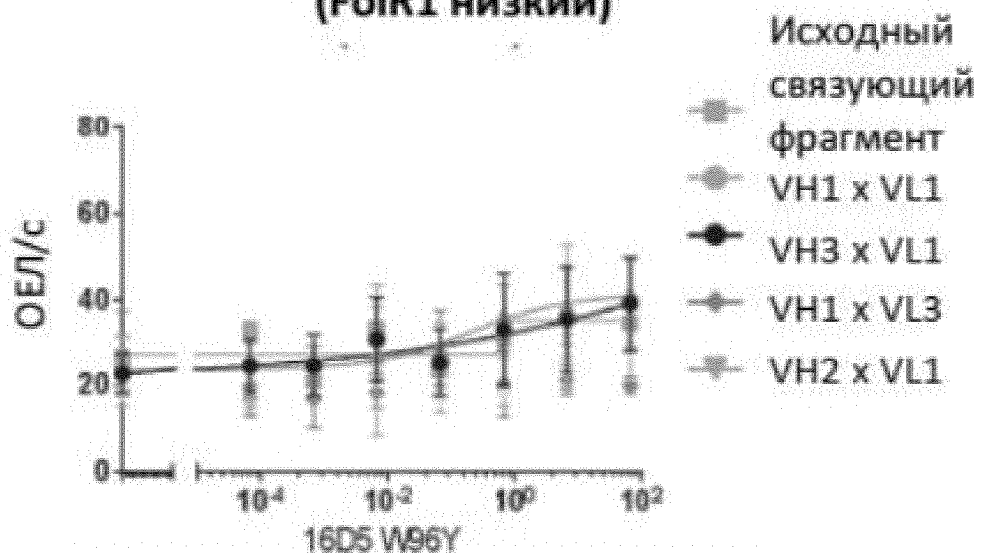
Фигура 4G



	EC50
Исходный связующий фрагмент	~ 0,7553
VH1 x VL1	1,681
VH3 x VL1	~ 0,6597
VL1 x VH3	4,124
VH2 x VL1	0,007609

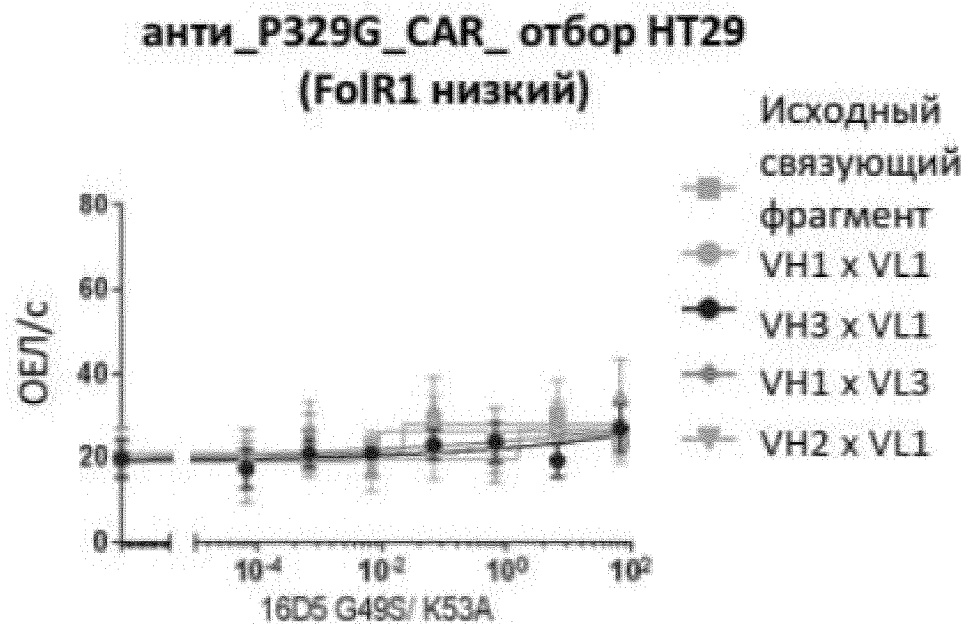
Фигура 4Н

анти_P329G_CAR_отбор HT29
(FoIR1 низкий)



	EC50
Исходный связующий фрагмент	~ 1883859
VH1 x VL1	~ 0,6734
VH3 x VL1	0,2125
VL1 x VH3	
VH2 x VL1	

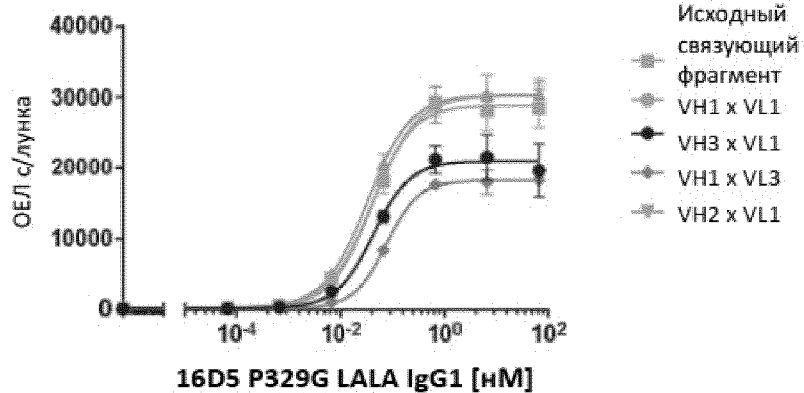
Фигура 4I



	EC50
Исходный связующий фрагмент	~ 6,169e+017
VH1 x VL1	~ 0,006323
VH3 x VL1	~ 0,002181
VL1 x VH3	~ 1,592
VH2 x VL1	~ 4,466e+18

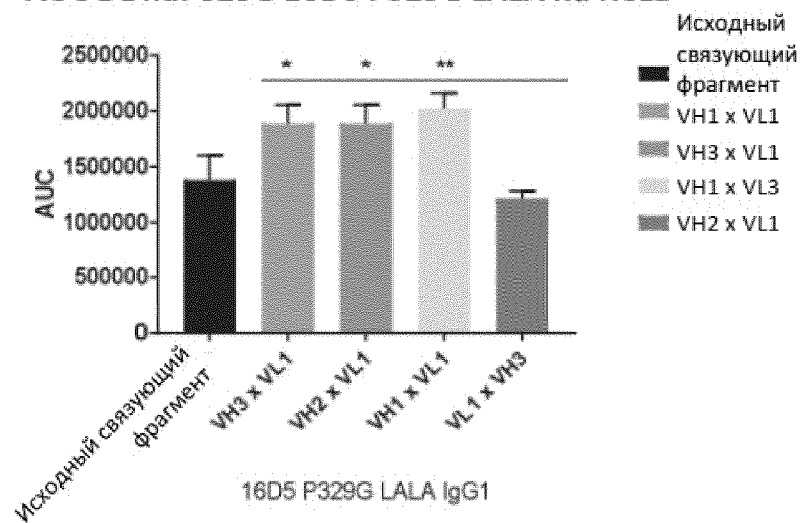
Фигура 5

А
DDhuP329G 16D5 P329G LALA на HeLa

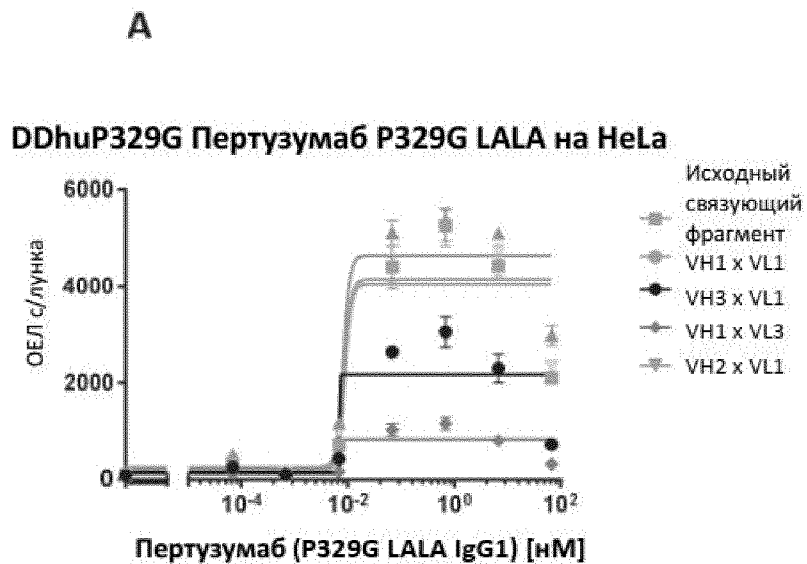


	EC50
Исходный связующий фрагмент	0,04284
VH1 x VL1	0,03942
VH3 x VL1	0,03319
VL1 x VH3	0,04236
VH2 x VL1	0,07668

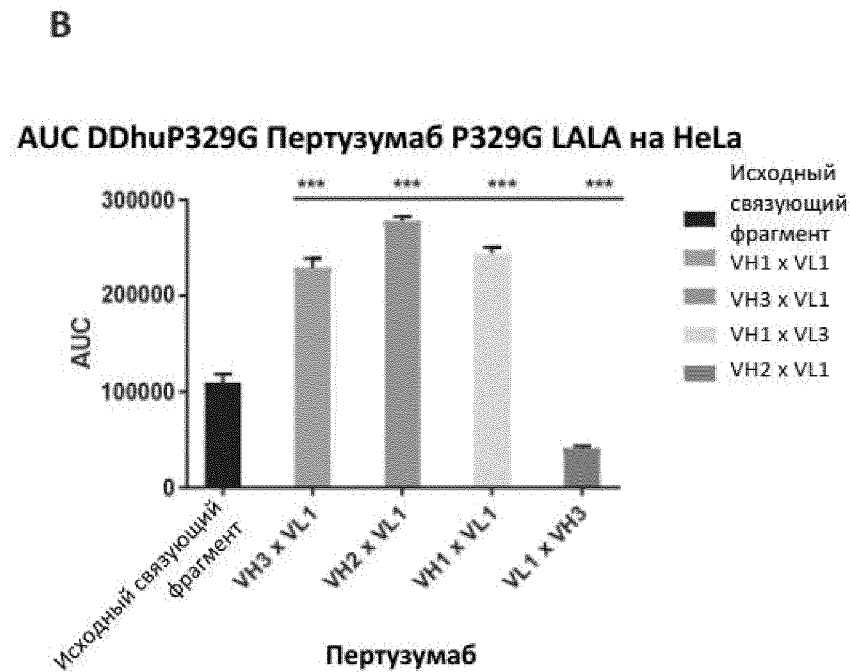
В
AUC DDhuP329G 16D5 P329G LALA на HeLa



Фигура 6

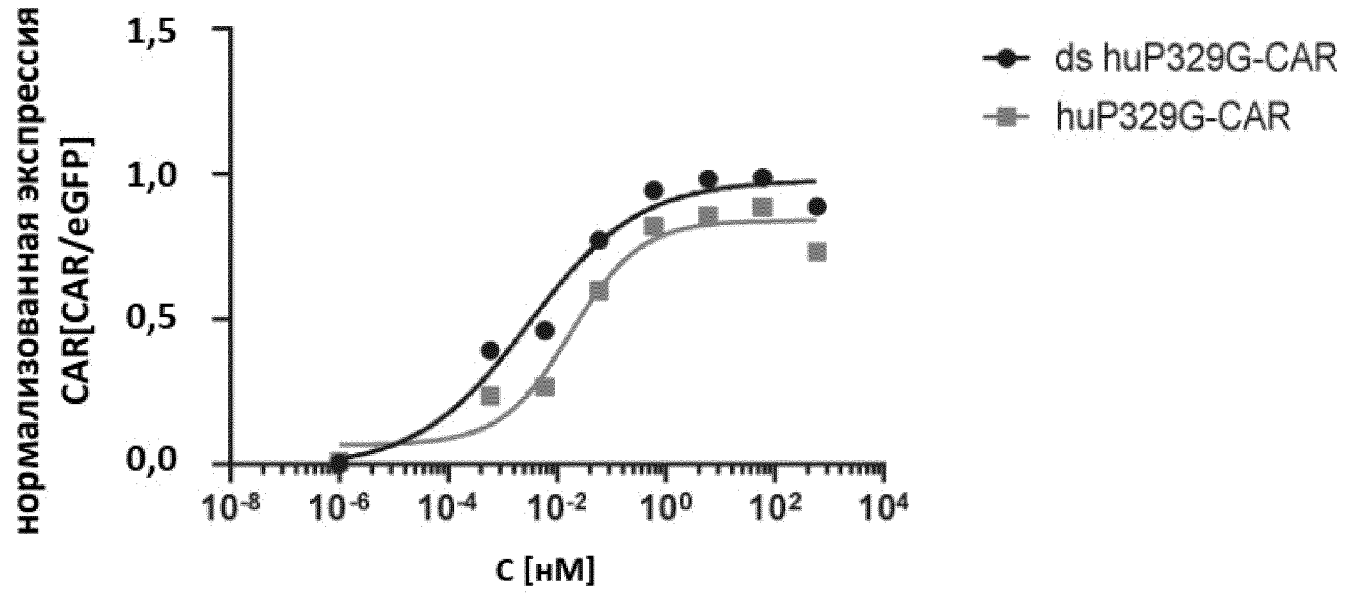


	EC50
Исходный связующий фрагмент	~ 0,006906
VH1 x VL1	~ 0,008634
VH3 x VL1	~ 0,008091
VL1 x VH3	~ 0,008236
VH2 x VL1	~ 0,007126

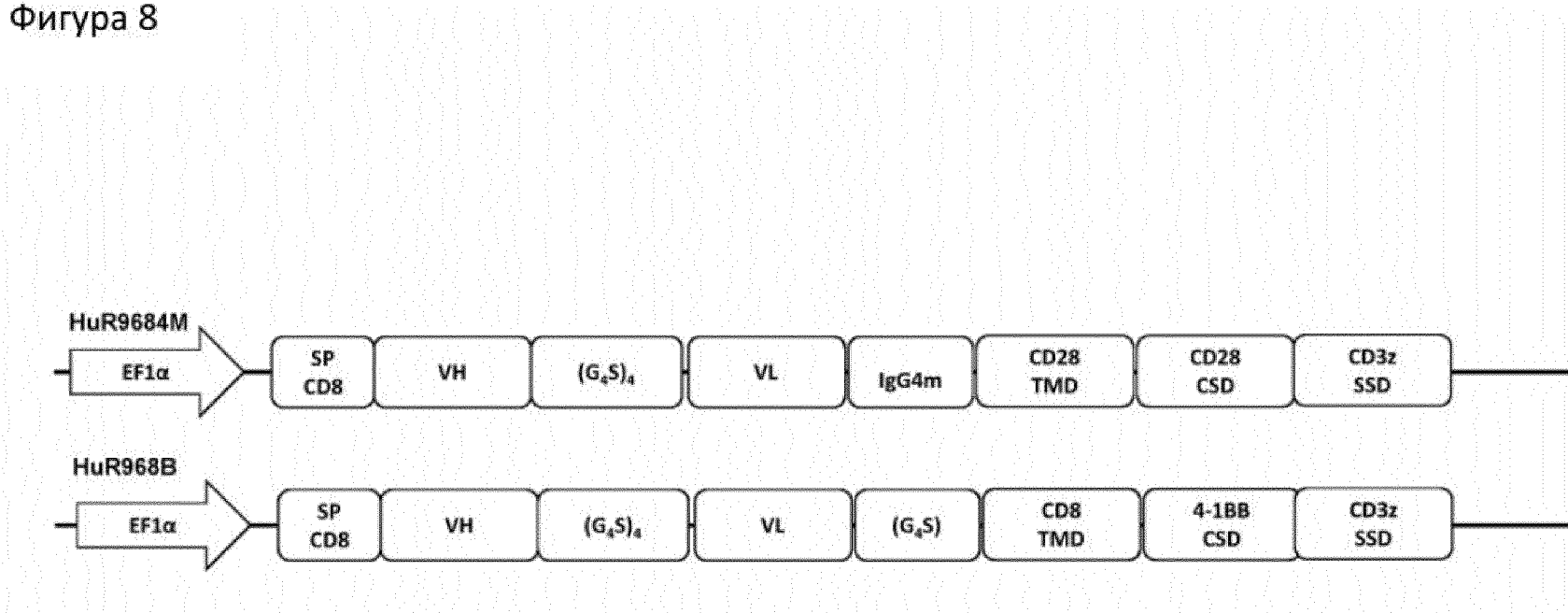


Фигура 7

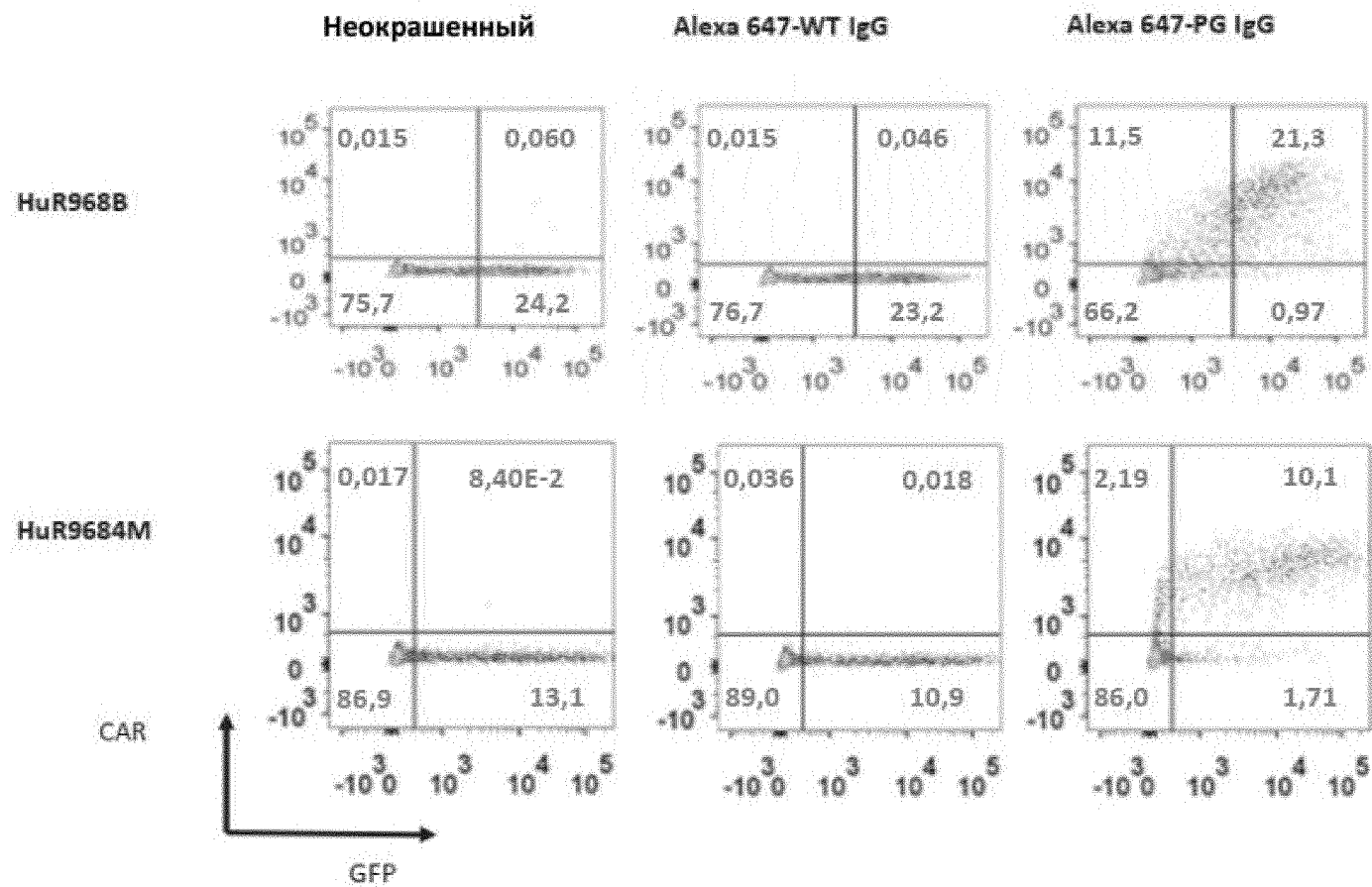
Нормализованная экспрессия CAR на поверхности клеток Jurkat NFAT Promega



Фигура 8

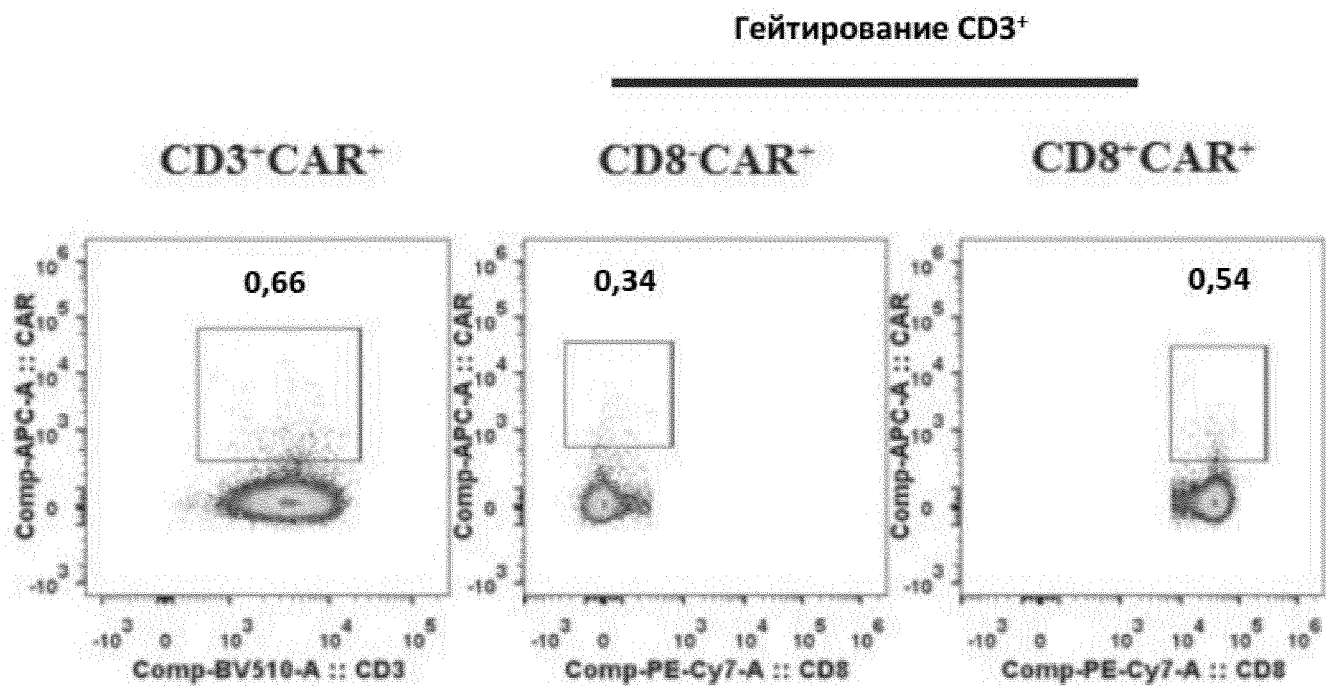


Фигура 9

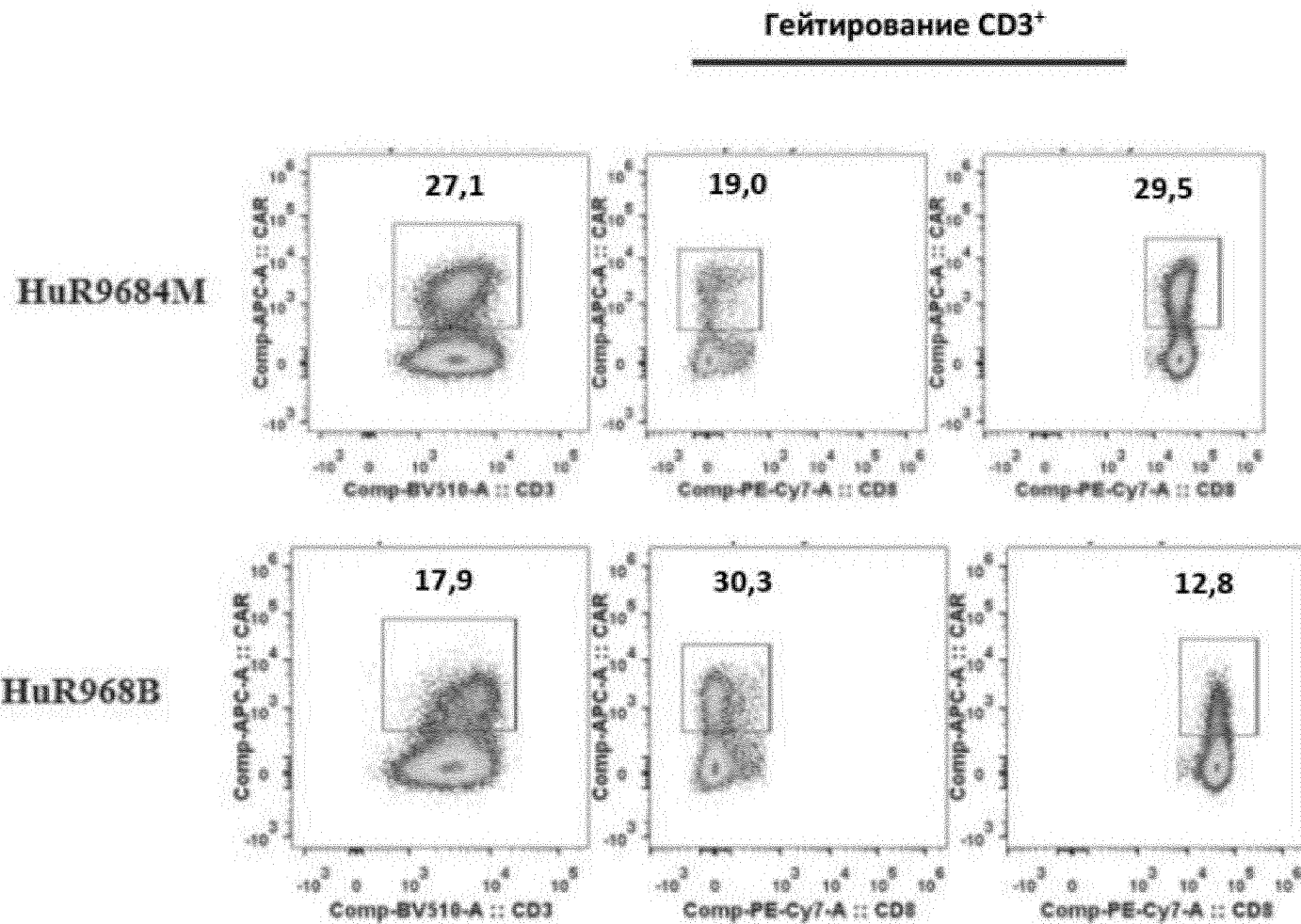


Фигура 10А

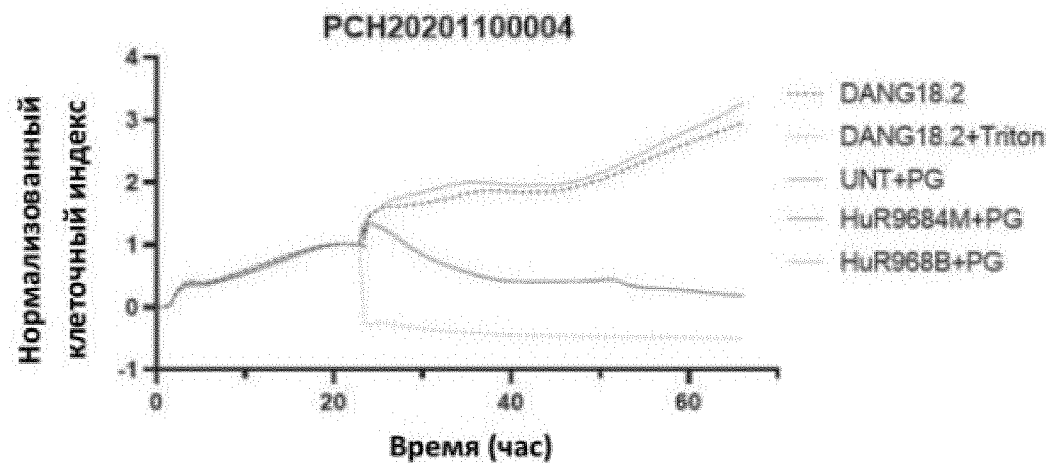
UNT



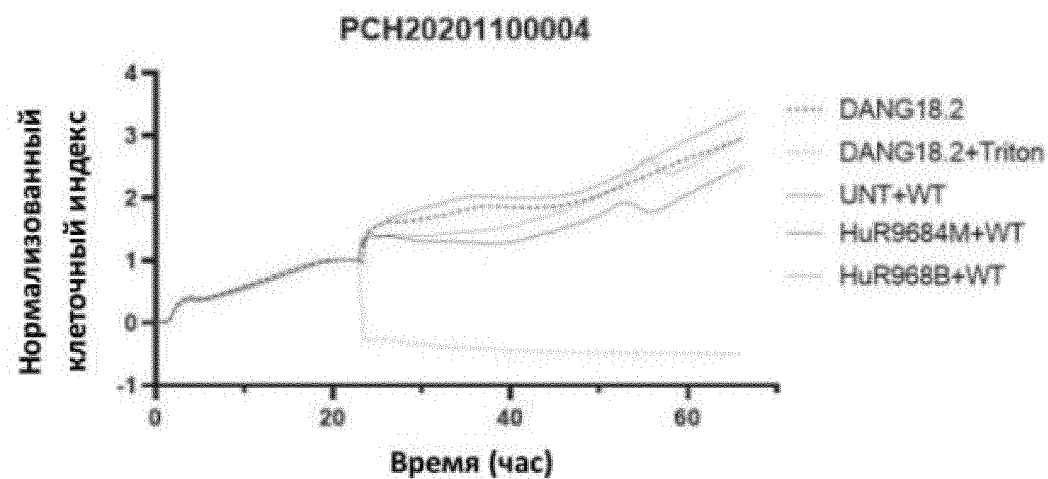
Фигура 10В



Фигура 11А



Фигура 11В



E:T=1:2, 100 нг/мл PG Ат; целевое: DANG18.2 клеток

Фигура 12

